ADRIANA HELENA DE ALMEIDA

**Dinâmica de proteínas de fase aguda e mensurações
ultra-sonográficas no concepto durante o
período gestacional em cadelas da raça Boxer**

São Paulo

2006

ADRIANA HELENA DE ALMEIDA

Dinâmica de proteínas de fase aguda e mensurações ultrasonográficas no concepto durante o período gestacional em cadelas da raça Boxer

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Franklin de Almeida Sterman

São Paulo
2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1815
FMVZ

Almeida, Adriana Helena de
Dinâmica de proteínas de fase aguda e mensurações ultra-sonográficas no concepto durante o período gestacional em cadelas da raça Boxer / Adriana Helena de Almeida. – São Paulo: A. H. Almeida, 2006.

110 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Franklin de Almeida Sterman.

1. Proteínas de fase aguda. 2. Ultra-sonografia. 3. Gestação. 4. Cães. 5. Boxer. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Correlação entre aspectos ultrasonográficos da gestação e níveis de prolactina, relaxina, progesterona e proteínas de fase aguda em cadelas da raça boxer", protocolo nº583/2004, utilizando 20 cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Franklin de Almeida Serman, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Correlation among ultrasonographic features of gestation and seric levels of prolactin, relaxin, progesterone and acute phase proteins in boxer bitches", protocol number 583/2004, utilizing 20 dogs, under the responsibility of Prof. Dr. Franklin de Almeida Serman agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 11 de fevereiro de 2005

Profª Drª Júlia Maria Matos
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ALMEIDA, Adriana Helena de

Título: Dinâmica de proteínas de fase aguda e mensurações ultra-sonográficas no conceito durante o período gestacional em cadelas da raça Boxer

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____
Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____
Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____
Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

DEDICO

À Deus, por iluminar o meu caminho.

**Aos meus pais, Laerte e Maurício, por constituírem os
alicerces da minha vida.**

**À minha família, pelo apoio e compreensão nos momentos de minha
ausência.**

Ao amigo Prof Dr Franklin de Almeida Sterman pela honra de sua orientação.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e aos docentes Antônio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, Franciso Javier Hernandez Blazquez, José Roberto Kfoury Júnior, Maria Angélica Miglino, Paula de Carvalho Papa e Pedro Primo Bombonato, por terem me oferecido esta oportunidade e pelos conhecimentos que adquiri neste período.

À FAPESP pelo apoio financeiro que viabilizou a realização deste trabalho.

Aos cães **Jasmine, Debbie, Kyra, Loreta, Minie, Manhattan, Tutty, Giulietta, Malu, Única** (*in memoriam*), **Mila, Linda Inês e Melissa, Morocco** (*in memoriam*), **Seth** (*in memoriam*), **Dartagnan, Leo, Isaac** (*in memoriam*) os meus agradecimentos. A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração desses animais incríveis.

Aos queridos amigos Flávia Tomas Verechia Pereira e Antônio Chaves de Assis Neto pelo auxílio na confecção deste trabalho.

À Profa Dra Lourdes Conceição Martins da Disciplina de Saúde Coletiva da Faculdade de Medicina da Faculdade Medicina da Fundação do ABC, pela paciência e tratamento estatístico dos resultados deste trabalho.

À Profa Dra Ana Carolina Brandão de Campos Fonseca Pinto e ao Prof. Dr. Stefano Carlo Filippo Hagen pelas sugestões fornecidas durante a execução deste projeto.

À Profa Dra Camila Infantsi Vannucchi pela valiosa colaboração na metodologia de processamento das proteínas.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela ajuda na adequação da tese às Diretrizes.

Aos secretários do Departamento de Cirurgia da FMVZ – USP, Maicon Barbosa da Silva e Jaqueline Martins Santana pela amizade e suporte burocrático durante todo o curso.

Ao Prof Dr Cláudio Alvarenga de Oliveira e à Priscila Viau do Departamento de Reprodução Animal, pelo auxílio no processamento das amostras de soro para obtenção das concentrações de progesterona.

À Profa. Dra Claudete Serrano Astolfi Ferreira, pesquisadora do Departamento de Patologia, pela valiosa ajuda na utilização dos kits para o processamento das proteínas de fase aguda.

Ao Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior, docente responsável pelo Laboratório de Técnicas Imunológicas Aplicadas à Morfofisiologia (LTIAM - VCI), por ter disponibilizado suporte para armazenamento das amostras de soro e equipamentos para a leitura dos resultados.

À Profa Dra Maria Amélia Zogno, pesquisadora do Departamento de Reprodução Animal, pelo apoio no processamento das amostras de soro.

Ao funcionário do Canil Auca Domus, Lázaro Fileto Júnior, pelo grande auxílio na realização das lâminas de citologia vaginal e coletas de sangue.

Ao meu irmão, André Soares de Almeida, pelo auxílio na confecção dos gráficos.

Ao criador José Antônio DeMarchi dos Santos pela ajuda na obtenção dos cães utilizados neste estudo.

À grande amiga e proprietária do Canil DeCesário, em Guaratinguetá – SP, Monique Rodrigues Cesário Silva, pelo apoio irrestrito e ajuda na obtenção dos animais e na idealização deste projeto.

RESUMO

ALMEIDA, A. H. **Dinâmica de proteínas de fase aguda e mensurações ultra-sonográficas no conceito durante o período gestacional em cadelas da raça Boxer**. [Dynamics of acute phase proteins and ultrasonographic mensurations of conceptus during gestation in Boxers]. 2006. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Os objetivos deste estudo foram: determinar a dinâmica de concentrações séricas de proteínas de fase aguda em cadelas gestantes e aspectos ultra-sonográficos da gestação, além de estabelecer uma possível correlação entre níveis séricos das mesmas proteínas, idade gestacional e aspectos ultra-sonográficos da gestação. Examinou-se 09 cadelas gestantes da referida raça com um aparelho portátil da marca GE[®], modelo Logic α 100 MP, equipado com um transdutor convexo 5,0 MHz e outro linear de 7,5 MHz, de 2 a 3 vezes por semana a partir do 18^o dia de gestação até o parto com a finalidade de mensurar as seguintes estruturas no conceito: DBP, DC e EP. Nos mesmos dias, coletou-se soro para dosagem de Hp, GAα1 e CRP por meio de kits comerciais (Phase Haptoglobin Assay[®], Canine α1 Acid Glycoprotein measurement kit[®]; Phase Canine C – Reactive Protein Assay[®], Tridelata Development Limited, respectivamente). As cadelas do grupo NG tiveram o soro coletado a partir do proestro ao fim do diestro. Foi possível dividir o período gestacional em 9 semanas, cada uma delas, da terceira à nona semana de gestação, foi associada a um determinado conjunto de características ultra-sonográficas no conceito. As mensurações ultra-sonográficas foram altamente correlacionadas à idade gestacional e resultou em um modelo ; $Y = 22,886 + 1,26 \text{ DBP} + 0,107 \text{ DC}$, onde Y = idade gestacional ($p < 0001$ e $R^2 = 0,99$). As concentrações séricas de Hp, GAα1 e CRP, no grupo G, foram significativamente maiores que no grupo NG a partir da 4^a semana de gestação. Essas variáveis não foram tão bem correlacionadas com a idade gestacional, quanto às mensurações ultra-sonográficas no conceito, contudo, pode-se afirmar que as concentrações séricas máximas de Hp, GAα1 e CRP ($11,11 \pm 1,7 \text{ mg/ml}$; $449,44 \pm 146,91 \text{ } \mu\text{g/ml}$ e $58,30 \pm 14,69 \text{ } \mu\text{g/ml}$) foram atingidas na 5^a semana de gestação. Foi possível ilustrar a dinâmica das proteínas e fase aguda (Hp, GAα1 e CRP) e das mensurações ultra-sonográficas (DBP, DC e EP), possibilitando a visualização do comportamento

dessas variáveis, uma em relação às outras, durante a gestação de cadelas da raça boxer.

Palavras-chave: Proteínas de fase aguda. Ultra-sonografia. Gestação. Cães. Boxer

ABSTRACT

ALMEIDA, A. H. **Dynamics of acute phase proteins and ultrasonographic mensurations of conceptus during gestation in Boxers**. [Dinâmica de proteínas de fase aguda e mensurações ultra-sonográficas no conceito durante o período gestacional em cadelas da raça Boxer]. 2006. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The aims of this study were: to set up the dynamics of acute phase proteins serum concentrations in pregnant bitches and ultrasonographic features of conceptus and make a correlation among acute phase proteins serum levels, ultrasonographic features of conceptus and gestational age. Serial ultrasonographic examinations were performed on 09 boxer bitches, 2 or 3 times per week from 18^o day of gestation until parturition. The used device is a portable GE®, Logic α 100 MP, equipped with a sectorial transducer 5,0 MHz and another linear one of 7,5 MHz. Embryonic and fetal parameters had been measured: DBP, DC e EP. Serum samples were collected in the same day and acute phase proteins (Hp, GAα1 e CRP) were measured by commercial kits (Phase Haptoglobin Assay ®, Canine α1 Acid Glycoprotein measurement kit ®; Phase Canine C – Reactive Protein Assay ®, Tridelta Development Limited). Serum samples of non pregnant bitches were collected from the beginning of proestrous to the end of diestrous. The gestational period was divided into 9 weeks, each one of them (from the 3rd to the 9th week of gestation) was associated to a range of ultrasonographic features of the conceptus. Ultrasonographic mensurations (DBP, DC e EP) were linearly correlated to gestational age. The R² values were > 0,9 in all cases, which indicates that more than 90% of the variability of gestational age was explained by any one of these measurements. Those mensurations were put in a multivariate model and resulted in a equation: $Y = 22,886 + 1,26 \text{ DBP} + 0,107 \text{ DC}$ ($p < 0,0001$ e $R^2 = 0,99$) that is able to estimate the gestational age. Hp, GAα1 e CRP serum concentrations were statistically more elevated in pregnant than in non pregnant bitches, from the 4th week of gestation until parturition. The acute phase proteins didn't presented good correlation to the gestational age like the ultrasonographic mensurations did, however it is possible to affirm that their concentrations reached maximum values (Hp = $11,11 \pm 1,7$ mg/ml, GAα1 = $449,44 \pm 146,91$ µg/ml e CRP = $58,30 \pm 14,69$

µg/ml) on the 5th week. The dynamic of the acute phase proteins (Hp, GAA1 e CRP) and ultrasonographic mensurations (DBP, DC e EP) was performed in order to visualise the profile of all mean measurements, one regarding to the other, during gestation in boxer bitches.

Key words: Acute phase proteins. Ultrasonography. Pregnancy. Dogs. Boxer.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Box-Plot das mensurações do diâmetro do corpo (DC) e idade gestacional, com representação da media, desvio padrão e valores máximo e mínimo – São Paulo – 2006.....	53
Gráfico 2 -	Box-Plot das mensurações do diâmetro biparietal (DBP) e idade gestacional, com representação da media, desvio padrão e valores máximo e mínimo – São Paulo – 2006.....	53
Gráfico 3 -	Box-Plot das mensurações da espessura da placenta (EP) e idade gestacional, com representação da media, desvio padrão e valores máximo e mínimo – São Paulo – 2006.....	54
Gráfico 4 -	Dispersão entre o diâmetro do corpo (DC) médio e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo – 2006.....	60
Gráfico 5 -	Dispersão entre o diâmetro biparietal (DBP) médio e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo – 2006.....	61
Gráfico 6 -	Dispersão entre a espessura da placenta (EP) média e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo – 2006.....	63
Gráfico 7 -	Valores médios representando valores médios de haptoglobina (mg/ml) durante as semanas em cadelas gestantes e não gestantes – São Paulo – 2006.....	65
Gráfico 8 -	Dispersão entre concentrações de haptoglobina (Hp) e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo – 2006.....	65
Gráfico 9 -	Dispersão entre concentrações de haptoglobina (Hp) e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo – 2006.....	66
Gráfico 10	Box-Plot das concentrações séricas da haptoglobina (Hp) e idade gestacional, com representação da media e desvio padrão – São Paulo – 2006.....	66
Gráfico 11	Dispersão entre valores máximos de haptoglobina e número de filhotes nascidos, com representação de R^2 – São Paulo – 2006.....	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 12 -	Valores médios glicoproteína ácida $\alpha 1$ (mg/ml) durante as semanas em cadelas gestantes e não gestantes – São Paulo – 2006.....	69
Gráfico 13 -	Gráfico de dispersão entre concentrações de glicoproteína ácida alfa 1 (GA alfa1) e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo–2006.....	69
Gráfico 14 -	Dispersão entre concentrações de glicoproteína ácida alfa 1 (GAalfa1) e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo – 2006.....	70
Gráfico 15 -	Box-Plot das concentrações séricas de glicoproteína ácida $\alpha 1$ (GA $\alpha 1$) e idade gestacional, com representação da media e desvio padrão – São Paulo – 2006.....	70
Gráfico 16 -	Dispersão entre valores máximos de glicoproteína ácida $\alpha 1$ e número de filhotes nascidos, com representação de R^2 – São Paulo– 2006.....	71
Gráfico 17 -	Valores médios das concentrações séricas de proteína C reativa (CRP) ($\mu\text{g/ml}$) durante as semanas em cadelas gestantes e não gestantes – São Paulo – 2006.....	73
Gráfico 18 -	Dispersão entre concentrações de proteína C reativa (CRP) ($\mu\text{g/ml}$) e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo – 2006.....	73
Gráfico 19 -	Dispersão entre concentrações de proteína C reativa (CRP) ($\mu\text{g/ml}$) e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo – 2006.....	74
Gráfico 20 -	Box-Plot das concentrações séricas de proteína C reativa (CRP) ($\mu\text{g/ml}$) e idade gestacional (semanas), com representação da media e desvio padrão – São Paulo – 2006.....	74
Gráfico 21 -	Dispersão entre valores máximos de CRP e número de filhotes nascidos, com representação de R^2 – São Paulo – 2006.....	75
Gráfico 22 -	Valores médios das mensurações ultra-sonográficas (DBP, DC e EP – em mm) e das proteínas Hp (mg/ml) (10^2), CRP ($\mu\text{g/ml}$) (10^1) e GA $\alpha 1$ ($\mu\text{g/ml}$), em função da idade gestacional (semanas) – São Paulo – 2006.....	83

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagem ultra-sonográfica de gestação no 20º dia de gestação. Animal posicionado em decúbito lateral, a bexiga (B) apresenta-se como um área relativamente anaecóica. Observa-se também em secção mediana, o corpo do útero (U) hipoeecóico e a primeira verificação do conceito (C) como estrutura esférica anaecóica, em seu interior..... 54
- Figura 2 - Imagem ultra-sonográfica de gestação no 24º dia, demonstrando a placenta (#) como uma formação hipereecóica contituindo a parede da vesícula embrionária e em seu interior, uma massa também hipereecóica, representando o embrião (*) em secção dorsal. O DC foi aferido em sua maior dimensão transversal (+)..... 55
- Figura 3 - Imagem ultra-sonográfica de gestação no 36º dia, demonstrando a placenta zonária (PZ), em secção sagital. Um aumento de volume nas extremidades da placenta, caracteriza o hematoma marginal (*). Observa-se também o feto (F) circunscrito nos limites da PZ e o saco vitelínico (SV), também em secção sagital, como 2 linhas hipereecóicas, paralelas e moderadamente enrugadas, que vão de um extremo ao outro do conceito..... 55
- Figura 4 - Imagem ultra-sonográfica de gestação no 36º dia. O feto encontra-se em secção dorsal, onde pode-se notar a cabeça (c) nitidamente distinta do tronco (t) fetal e o saco amniótico (S) como uma linha hipereecóica envolvendo o feto. As cabeças de setas sólidas indicam o CCR e a letra E refere-se ao estômago fetal representado por uma cavidade anaecóica. O DBP é mensurado entre os ossos parietais, como mostram as setas verticais..... 56
- Figura 5 - Imagem ultra-sonográfica de gestação no 37º dia, ilustrando o conceito em secção transversal, evidenciando o saco vitelínico (SV) também em secção transversal, como uma vesícula de contornos hipereecóicos e moderadamente pregueada..... 56
- Figura 6 - Imagem ultra-sonográfica de gestação no 31º dia, mostrando um feto em secção dorsal, evidenciando os brotos dos membros torácicos e pélvicos (*)..... 57
- Figura 7 - Imagem ultra-sonográfica de gestação no 46º dia, ilustrando o corpo fetal em secção transversal, passando pelo estômago (E) e pelo fígado (F) fetais, com a finalidade de mensurar o DC..... 57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 8 - Imagem ultra-sonográfica de gestação no 47º dia, mostrando o rim direito por meio da evidenciação de pelve renal dilatada, representada por uma área anaecóica no interior deste órgão. O estômago fetal está repleto e apontado pela letra E..... 58
- Figura 9 - Imagem ultra-sonográfica de gestação no 46º dia, ilustrando o corpo fetal em secção transversal evidenciando cordão umbilical (U), em secção longitudinal..... 58
- Figura 10- Imagem ultra-sonográfica de gestação no 54º dia, mostrando o corpo fetal em secção dorsal de maneira a evidenciar os pulmões (p), o coração (c), o fígado (f), as alças intestinais individualizadas (i) e a bexiga (b) fetais..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Diâmetro do Corpo (DC) médio, por animal e por idade gestacional (em semanas), durante o período em que foi aferido – São Paulo – 2006.....	60
Tabela 2 -	Diâmetro Biparietal (DBP) médio, por animal e por idade gestacional (em semanas), durante o período em que foi aferido – São Paulo – 2006.....	61
Tabela 3 -	Espessura da Placenta (EP) média, por animal e por idade gestacional (em semanas), durante o período em que foi aferido – São Paulo – 2006.....	62
Tabela 4 -	Valores médios e desvios padrão das concentrações séricas de haptoglobina durante as semanas de diestro e de gestação – São Paulo – 2006.....	64
Tabela 5 -	Valores médios e desvios padrão das concentrações séricas de glicoproteína ácida $\alpha 1$ em cadelas não gestantes e gestantes – São Paulo – 2006.....	68
Tabela 6 -	Valores médios e desvios padrão das concentrações séricas de proteína C reativa em cadelas não gestantes e gestantes – São Paulo – 2006.....	72
Tabela 7 -	Correlação de Pearson entre as variáveis DBP,DC e EP, com representação de CP (coeficiente de correlação de Pearson), P (índice de significância) e N (número de amostras correlacionadas) – São Paulo – 2006.....	76
Tabela 8 -	Coeficientes e desvios padrões obtidos da análise de regressão multivariada e construção do modelo para estimar a idade gestacional.....	76
Tabela 9 -	Correlação de Pearson entre as variáveis GA $\alpha 1$, Hp e CRP, de todo o período gestacional, com representação de CP (coeficiente de correlação de Pearson), P (índice de significância) e N (número de amostras correlacionadas) – São Paulo – 2006.....	78
Tabela 10-	Correlação de Pearson entre as variáveis GA $\alpha 1$, Hp e CRP, da 1ª à 5ª semana de gestação, com representação de CP (coeficiente de correlação de Pearson), P (índice de significância) e N (número de amostras correlacionadas) – São Paulo – 2006.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 11 -	Correlação de Pearson entre as variáveis GA α 1, Hp e CRP, da 5 ^a à 10 ^a semana de gestação, com representação de CP (coeficiente de correlação de Pearson), P (índice de significância) e N (número de amostras correlacionadas) – São Paulo – 2006.....	79
Tabela 12 -	Correlação de Pearson entre as variáveis GA α 1, Hp, CRP, DBP, DC e EP, de todo o período gestacional, com representação de CP (coeficiente de correlação de Pearson), P (índice de significância) e N (número de amostras correlacionadas) – São Paulo – 2006.....	80
Tabela 13 -	Correlação de Pearson entre as variáveis GA α 1, Hp, CRP, DBP, DC e EP, da 1 ^a à 5 ^a semana de gestação, com representação de CP (coeficiente de correlação de Pearson), P (índice de significância) e N (número de amostras correlacionadas) – São Paulo – 2006.....	81
Tabela 14 -	Correlação de Pearson entre as variáveis GA α 1, Hp, CRP, DBP, DC e EP, da 5 ^a semana de gestação até o parto, com representação de CP (coeficiente de correlação de Pearson), P (índice de significância) e N (número de amostras correlacionadas) – São Paulo – 2006.....	81
Tabela 15 -	Valores médios e desvios padrão das mensurações ultrasonográficas (DBP, DC e EP) e das proteínas de fase aguda (Hp, CRP e GA α 1) em cadelas gestantes – São Paulo – 2006.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	área do corpo
CC	comprimento da cabeça
CCR	comprimento “crown-rump”
CF	comprimento do fêmur
CRP	proteína C reativa
DBP	diâmetro biparietal
DC	diâmetro do corpo
DTC	diâmetro transversal do concepto
ELISA	“enzyme-linked immunosorbent assay
EP	espessura da placente
G	gestante
GA α 1	glicoproteína ácida alfa 1
HbCN	cianometahemoglobina
HC	altura da cabeça
Hp	haptoglobina
LH	hormônio luteinizante
LP	Largura da placenta
NG	não - gestante
PC	perímetro da cabeça
SV	saco vitelino

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	A GESTAÇÃO	25
2.2	A ULTRA-SONOGRAFIA	28
2.3	AS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA	30
2.3.1	Proteínas C reativa (CRP)	33
2.3.2	Haptoglobina (Hp)	35
2.3.3	Glicoproteína ácida α 1 (GAα1)	36
3	MATERIAL E MÉTODO	38
3.1	ANIMAIS E GRUPOS DE ESTUDO	38
3.2	COLETA DAS AMOSTRAS	39
3.3	EXAMES ULTRA-SONOGRÁFICOS	40
3.4	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE HAPTOGLOBINA, PROTEÍNA C REATIVA E GLICOPROTEÍNA ÁCIDA α 1	42
3.4.1	Ensaio de haptoglobina (HP)	43
3.4.2	Ensaio de proteína C reativa canina (CRP)	43
3.4.3	Ensaio de glicoproteína ácida α1 canina (GAα1)	44
3.5	DOSAGEM HORMONAL DE PROGESTERONA SÉRICA	44
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4	RESULTADOS	47
4.1	DETECÇÃO E APARÊNCIA ULTRA-SONOGRÁFICAS DAS ESTRUTURAS ESTUDADAS NA GESTAÇÃO	47
4.1.1	Duração da Gestação e Número de Filhotes por Ninhada	47
4.1.2	Terceira semana de gestação (15° ao 21° dia)	47
4.1.3	Quarta semana de gestação (22° ao 28° dia)	48
4.1.3.1	Placenta e Membranas Fetais	48
4.1.3.2	Embrião	48
4.1.4	Quinta semana de gestação (29° ao 35° dia)	49
4.1.4.1	Placenta e Membranas Fetais	49
4.1.4.2	Feto	50
4.1.5	Sexta semana de gestação (36° ao 42° dia)	50
4.1.5.1	Placenta e Membranas Fetais	50
4.1.5.2	Feto	51
4.1.6	Sétima semana de gestação (43° ao 49° dia)	51
4.1.6.1	Placenta e Membranas Fetais	51
4.1.6.2	Feto	52
4.1.7	Oitava semana de gestação (50° ao 56° dia)	52
4.1.8	Nona semana de gestação (57° ao 63° dia) até o parto (65° $\pm$ 1 dia)	52
4.2	MENSURAÇÕES DOS PARÂMETROS GESTACIONAIS SELECIONADOS	59
4.2.1	Diâmetro do corpo (DC)	59
4.2.2	Diâmetro Biparietal (DBP)	61
4.2.3	Espessura de Placenta (EP)	62

4.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA SELECIONADAS.....	63
4.3.1	Haptoglobina (Hp)	63
4.3.2	Glicoproteína ácida $\alpha 1$ (GAα1)	67
4.3.3	Proteína C reativa (CRP)	71
4.4	CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS DBP, DC E EP E A IDADE GESTACIONAL.....	75
4.5	CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS GA α 1, Hp e CRP E A IDADE GESTACIONAL.....	77
4.6	CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE GA α 1, Hp e CRP E AS MENSURAÇÕES ULTRA-SONOGRÁFICAS DO DBP, DC E EP.....	79
4.7	DINÂMICA DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA (Hp, CRP e GA α 1) E MENSURAÇÕES ULTRASONOGRÁFICAS NO CONCEPTO (DBP, DC e EP) DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL.....	84
5	DISCUSSÃO	85
6	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	104

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da gestação seja no homem ou nos animais, é marcado por grandes alterações do sistema reprodutor feminino e também pelo surgimento e maturação de estruturas antes inexistentes, tais como conceitos: embrião, feto e membranas fetais. Por isso, faz-se necessário um acompanhamento de todas as fases da gestação através de um método seguro, indolor e não estressante.

A ultra-sonografia apresenta essas características, pois não oferece riscos comprovados à mãe ou ao conceito, mesmo quando é utilizada diversas vezes em uma mesma gestação, não é invasiva, possibilita observação dos eventos da prenhez e pode ser utilizada sem a necessidade de sedação.

Estudos recentes (ALMEIDA, 2002; BECCAGLIA; LUVONI, 2004; CONCANNON et al., 2000; CONCANNON et al., 2001; KUTZLER et al., 2003; SHILLE;GONTAREK, 1985; SON et al., 2001; YEAGER et al.; 1992) têm correlacionado mensurações de estruturas presentes no conceito com a idade gestacional.

Além das mensurações, outros estudos correlacionaram positivamente as concentrações séricas de proteínas de fase aguda com diferentes tempos da gestação (ECKERSALL et al., 1993; MURATA, 2004; KURIBAYASHI et al., 2003; VANNUCCHI et al; 2002).

Em medicina canina, entre as proteínas de fase aguda que são consideradas importantes marcadores de inflamação e infecção estão: a haptoglobina, a proteína C reativa e a glicoproteína ácida α_1 (ECKERSALL et al., 1993). Tais proteínas são produzidas no fígado, pelos hepatócitos, induzidas por citocinas (ENGLER, 1995; GRUYS et al., 1993; GRUYS et al., 2005; PETERSEN et al, 2004).

As proteínas de fase aguda não são apenas produzidas em condições patológicas, inflamatórias ou traumáticas, mas também em situações fisiológicas normais, como a gestação. Neste caso, são sintetizadas e secretadas em resposta à reação inflamatória generalizada causada pela invasão embrionária no endométrio.

A estimativa da idade gestacional auxilia no manejo de cadelas gestantes, onde a data de acasalamento é desconhecida ou quando o dia de nível máximo de produção de hormônio luteinizante (LH) não foi determinado. Clinicamente, tal informação é útil em casos onde é necessário diferenciar os sintomas de parto

normal, prematuro ou aborto, como por exemplo, quando há insuficiência luteal e a necessidade de tratamento com progesterona para a manutenção da gestação até a data programada para o parto (PURSWELL, 1991).

Sendo assim, este estudo tem o objetivo de:

- 1 determinar uma dinâmica de concentrações séricas de proteínas de fase aguda em cadelas gestantes e aspectos ultra-sonográficos da gestação;
- 2 estabelecer uma possível correlação entre níveis séricos de proteínas de fase aguda, idade gestacional e aspectos ultra-sonográficos da gestação;

A obtenção de valores que caracterizem a idade gestacional por meio da ultra-sonografia é importante, pois permite confrontar a cronologia do surgimento dos órgãos e estruturas fetais (incluindo sua ecogenicidade) e variáveis extra-gestacionais, como por exemplo as proteínas de fase aguda, com as dimensões de estruturas relacionadas ao conceito. Este procedimento auxilia a detecção de alterações no desenvolvimento do embrião ou feto, tal como ocorre em determinadas condições patológicas, metabólicas ou toxicológicas, assim como possibilita estimar o dia do parto em gestações normais.

2. Revisão da Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A GESTAÇÃO

Os ovócitos da cadela são liberados em um estado imaturo, como ovócitos primários, e como tal, não podem ser fertilizados. A fertilização ocorre somente após a maturação do ovócito primário, isto é, após a expulsão do primeiro corpúsculo polar e a conclusão de primeira divisão meiótica, sendo denominado ovócito secundário. Na maioria das espécies, essa maturação ocorre antes da ovulação, mas no cão e na raposa não é concluída antes de 48 horas após a ovulação. A ovulação acontece quando há um aumento abrupto na concentração plasmática de LH (hormônio luteinizante). Nos cães, a ovulação ocorre 2 dias (38 a 58 horas) após o tal aumento de níveis plasmáticos de LH e os ovócitos permanecem viáveis no sistema reprodutor feminino por mais 4 ou 5 dias (ENGLAND; CONCANNON, 2002).

Os períodos comportamentais do proestro e estro são definidos baseados em pronta aceitação do macho pela fêmea, a transição do comportamento de proestro para estro pode ser rápida ou lenta, e pode ocorrer na eminência, concomitantemente ou ainda alguns dias após o aumento plasmático de LH pré-ovulatório. (ENGLAND; CONCANNON, 2002).

O período de fertilização das cadelas ocorre quando ovócitos viáveis encontram-se disponíveis nas tubas uterinas e estão suficientemente maduros para serem fertilizados pelo espermatozóide. Tipicamente, a maioria das cadelas tem este período entre 4 a 7 dias após o aumento plasmático pré-ovulatório de LH, isto é, de 2 a 5 dias após a ovulação, em alguns casos extremos pode se estender até 8 ou 9 dias após o pico de LH, mas com fertilidade reduzida.

Conceitualmente, o período de fertilização se diferencia do período fértil por ser, este último, o período de tempo em que um acasalamento ou inseminação pode resultar em gravidez, ou seja, não apenas inclui o período de fertilização, mas também alguns dias antes. Assim, o período fértil pode ser considerado a partir de três dias antes do aumento pré-ovulatório de LH até sete dias após este aumento, e

pode ser até maior quando o padreador possui qualidade de sêmen excepcional ou quando a cadela apresentar ovócitos que sobrevivam 1 ou 2 dias além do habitual.

A data do acasalamento, que pode ocorrer a qualquer momento no período fértil, senão em todo ele, não é um bom referencial para datar a gestação, pois apesar da ovulação ocorrer em um período médio de 12 dias após o início do proestro, algumas cadelas ovulam, precocemente, no dia 5 e outras, 30 dias após o início do proestro. Por esta razão, acasalamentos no 12º e no 14º dias, que são comuns na prática de criação, frequentemente não resultam em concepção. Fisiologica e endocrinologicamente, o dia “0” do ciclo (e também de uma eventual gestação) é o dia onde ocorre o aumento de LH, evento que dispara a ovulação dos folículos ovarianos, 2 dias depois. Isto pode ou não coincidir com uma transição evidente dos comportamentos de proestro e estro.

A mensuração da concentração de progesterona plasmática é um método confiável e preciso para a determinação do momento ideal para o acasalamento e também para estimar o dia em que ocorreu o aumento pré-ovulatório de LH e o dia da ovulação (ROOT-KUSTRITZ, 2005). Em coletas de sangue seriadas a partir do início do proestro, o dia da ovulação é determinado quando a concentração plasmática de progesterona atingir 2 ng/ml ou mais (HASE et. al., 2000).

Os eventos da gestação canina parecem ocorrer consistentemente entre cadelas, com relação ao pico pré-ovulatório de LH. Aparentemente, a clivagem embriológica entre os estágios de 2 e 16 células ocorre mais rapidamente no caso de fertilização de oócitos mais maduros, este fato explica o motivo pelo qual a duração da gestação é similar entre cadelas que acasalaram antes ou poucos dias após a maturação dos oócitos (BYSTED et al., 2001).

Um trabalho de Concannon, Tsutsui e Shille, publicado em 2001, discorre sobre desenvolvimento embrionário, exigências hormonais e respostas maternas durante a gestação em cães. Neste estudo, foi observado que o final da migração e a localização definitiva dos embriões ocorrem entre os dias 16 e 20 e que as vesículas no lúmen uterino são maiores que 1mm de diâmetro nos dias 17 a 19, vesículas maiores que 2 mm de diâmetro e alongada de 3 a 6 mm, nos dias 20 a 22. Alguns aumentos de blastocistos ocorrem entre os dias 14 e 20, e a expansão dentro das vesículas uterinas previne o efluxo de embriões intactos após o dia 20 ou 21. Intumescências uterinas podem ser observadas *in vivo*, ainda que inconsistentemente, nos dias 21 a 22 quando da fixação embrionária ou mesmo

antes da invasão do embrião no endométrio. blatocistos permanecem não fixados até os dias 21 a 22, a invasão do trofotoderma placentário ocorre do dia 22 ao dia 23, e apenas 1 a 2 dias antes de batimentos cardíacos poderem ser detectados por ultra-sonografia. O ensaio para relaxina canina, por radioimunoensaio específico, detectou aumentos das concentrações séricas entre 26º ao 30º dia de gestação e concomitantemente ao aumento da concentração de prolactina e não antes do aumento das concentrações séricas de proteínas de fase aguda, incluindo fibrinogênio. O perfil precoce dos aumentos iniciais nas concentrações de proteínas de fase aguda, relacionados à gestação, não são interessantes apenas para o diagnóstico da gestação, mas também em termos de possíveis inter-relações fisiológicas.

England et al., em 1990, desenvolveram um trabalho, com cadelas das raças Labrador Retriever e Golden Retriever, e cadelas mestiças com essas raças, no qual, através de exames ultra-sonográficos, acompanharam o desenvolvimento de conceptos a fim de estabelecer quais eventos da gestação poderiam ser utilizados para caracterizar o crescimento embrionário e fetal e a idade gestacional. Os parâmetros utilizados no começo da gestação foram: diâmetro do embrião, espessura combinada do útero e membranas fetais e comprimento occipito-sacral.

Eilts et. al., em 2005, realizaram um estudo retrospectivo para determinar os efeitos da idade, raça, paridade e tamanho da ninhada na duração da gestação em cadelas. Para tanto, monitoraram cadelas, de 2 localidades, do acasalamento até o parto. Um total de 764 ninhadas de 308 cadelas (36 hounds de grande porte, 34 golden retrievers, 23 pastores alemães e 215 labradores retrievers). O parto foi previsto para ocorrer em 57 dias após o primeiro dia de diestro citológico, nos hounds e para 65 dias após o início do aumento de progesterona nas outras raças. A média da duração da gestação (calculada somando-se 8 dias antes do dia 1 do diestro citológico nos hounds e medida a partir do início do aumento sérico de progesterona nas demais raças) por raça (dias +/- desvio padrão) foi de 66,0 +/- 2,8, 64,7 +/- 1,5, 63,6 +/- 2,1 e 62,9 +/- 1,3 dias para os hounds, golden retrievers, pastores alemães e labrador retrievers, respectivamente. Idade ou paridade não tiveram efeito na duração da gestação. O labrador retriever apresentou uma gestação mais longa que as demais raças estudadas. Cadelas que pariram quatro ou menos filhotes, tiveram, significativamente, uma gestação mais longa (em média 1 dia) que aquelas com cinco ou mais filhotes paridos.

Okkens et al. (1993), estudaram a influência do tamanho da ninhada e raça na variação da duração da gestação em cães. Utilizaram 77 cães de diferentes raças, a data do acasalamento foi determinada por meio da dosagem de progesterona sérica. A duração média da gestação foi de $62,1 \pm 0,2$ dias, com variação de 11 dias, o número de filhotes aparentou influenciar a duração da gestação, mas apresentou-se negativamente correlacionado com a duração da gestação ($R^2 = -0,96$, $p < 0,001$, $n = 44$). A condição primípara/múltipara da cadela não influenciou na duração da gestação. Em 2001, Okkens et al. sugeriram que a raça é o fator mais determinante na duração da gestação em cadelas e que a raça da cadela é responsável por diferenças em tamanho de ninhadas relacionadas à raça.

No cão, como em outros carnívoros, a placenta coriovitelina é estabelecida em períodos iniciais da gestação e ocorre pela invasão do mesoderma vascular na onfalopleura bilaminar. Subsequentemente, o exoceloma invade esta área e separa a esplancnopleura, vascularizada, do saco vitelino da somatopleura extraembrionária (ou córion verdadeiro), não-vascularizada, com exceção de duas extremidades mesodermis filiformes que permanecer anexadas ao córion. O alantóide expande-se para o interior do exoceloma, estabelecendo-se entre o SV e o córion. O saco vitelino permanece até o nascimento como uma bolsa altamente vascularizada, grande e enrugada (LEE; MOSSMANN et al.; 1983).

2.4 A ULTRA-SONOGRAFIA

A ultra-sonografia é uma técnica amplamente usada para diagnóstico precoce da gestação, determinação da viabilidade fetal na cadela, realização de mensurações fetais e detecção de reabsorção embrionária e fetal. A desvantagem desta técnica é a estimativa imprecisa do número de fetos de uma gestação. O método ultra-sonográfico para o diagnóstico de gestação é idêntico ao da visualização trans-abdominal. Embora os transdutores de 5 e 7,5 MHz sejam mais utilizados, a regra geral é selecionar o transdutor de maior frequência (maior resolução de imagem) que proporcione profundidade suficiente de imagem (SAUNDERS, 1992).

A idade gestacional pode ser determinada por meio da ultra-sonografia, por 2 métodos: mensuração e aparência de estruturas visíveis. Estudos feitos utilizando-se cadelas de conformação uniforme e datas calculadas a partir do aumento de LH ou do dia do parto, mostraram que parâmetros como diâmetro interno do saco gestacional, diâmetro do corpo e espessura da placenta têm grande relação com a idade gestacional (ALMEIDA, 2002; LUVONI e GRIONI 2000; SON et al., 2001) assim como o comprimento occipito-sacral (comprimento crown-rump - CCR) no segundo terço da gestação (ALMEIDA, 2002; KUTZLER et al., 2003).

O diagnóstico precoce, por meio de palpação ou de ultra-sonografia, ocorre aproximadamente 20 dias após o aumento pré-ovulatório de LH (aproximadamente 18 dias após a ovulação) (SHILLE; GONTAREK, 1985) e é feito com base na identificação do blastocisto, uma estrutura esférica e hiperecótica, de 2 a 3 mm, rodeada por uma margem hiperecótica dentro do útero. No 23º dia após o aumento de LH, a massa embrionária pode ser identificada e no 24º dia os batimentos cardíacos são detectáveis. A placenta zonária é perceptível no 25º dia e os batimentos cardíacos são claros no 28º e no 36º dia os brotos dos membros são detectáveis. No 38º dia o embrião é ainda mais curto que a cinta placentária e começa a ficar mais longo a partir do 42º dia. A individualização das alças intestinais é visualizada a partir do 57º dia (ALMEIDA, 2002; CONCANNON, 2000).

A detecção de embriões viáveis se faz com a observação dos batimentos cardíacos fetais, movimentação (a partir do 31º dia) e desenvolvimento do corpo (SAUNDERS, 1992).

Almeida, em 2002, sugeriu a divisão da gestação canina em 3 períodos de aproximadamente 20 dias cada um com base nas observações do aparecimento e relação anatômica entre as estruturas estudadas por ultra-som. O primeiro período não é detectável pela ultra-sonografia, o segundo período tem início entre o 46º e o 43º dia antes do parto (DAP) (entre o 19º e o 22º dia de gestação após o aumento pré-ovulatório de LH), com a observação dos conceitos e termina quando se evidencia o estômago fetal e nota-se que o CCR ultrapassa os limites da placenta zonária anular, entre o 26º e o 23º DAP (entre 39º e o 42º dia de gestação), marcando também o início do terceiro período da gestação, o qual termina no dia do parto.

Root-Kustritz, em 2005, revisou as novas e tradicionais técnicas para diagnóstico de gestação. Das técnicas de imagem que resultam o maior número de informações, a ultra-sonografia foi a técnica preferida para avaliar a viabilidade fetal e a radiografia como técnica preferida para avaliar o tamanho da ninhada.

Com a finalidade de associar características ultra-sonográficas da placenta e do feto de clones somáticos bovinos e compara-las às concentrações maternas de glicoproteína sérica PSP60 (pregnancy serum protein 60 – produzida pela placenta), Chavatte-Palmer et al. (2006) analisaram sistematicamente o desenvolvimento da placenta e do feto no primeiro trimestre de gestação de animais gestantes de fetos clonados e concebidos naturalmente. A glicoproteína sérica PSP60 está possivelmente comprometida com o super crescimento de fetos clonados de bovino.

A ultra-sonografia também tem sido aplicada a várias outras espécies como instrumento para monitorar a gestação, como referido, citando poucos exemplos, em bovinos por Pierson (1984) e Kähn (1989), em suínos por Kauffold (1997), em caprinos por Martinez et al. (1998), em ovinos por Sergeev (1990), em eqüinos por Pipers (1984) e em felinos por Davidson et al. (1986).

2.5 AS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA

A resposta de fase aguda é uma reação inflamatória inespecífica que ocorre pouco depois de uma injúria tecidual qualquer. Esta resposta inclui mudanças na concentração de proteínas plasmáticas, chamadas proteínas de fase aguda (APPs), algumas delas diminuem sua concentração (APPs negativas), tais como a albumina e a transferrina, e outras aumentam (APPs positivas), como por exemplo, proteína C reativa, glicoproteína ácida alfa 1, amilóide sérico A, haptoglobina e ceruloplasmina. A maioria das APPs positivas é glicoproteína sintetizada, principalmente por hepatócitos sob estimulação por citocinas pro-inflamatórias e lançadas na corrente circulatória (CERON et. al., 2005).

Sobre a função biológica da resposta das proteínas de fase aguda, Petersen et al. (2004) afirmaram que apesar das APPs produzirem uma resposta a uma injúria tecidual, podem participar da proteção ao hospedeiro. Por exemplo: a haptoglobina

(Hp) liga-se à hemoglobina liberada por eritrócitos danificados e junto com a hemopexina e a transferrina, ajuda a diminuir os efeitos deletérios do ferro livre, ou seja, restringe a disponibilidade do ferro livre para a multiplicação de bactéria invasora. Recentemente foi demonstrado que algumas APPs compartilham a capacidade de regular a produção de citocinas pro-inflamatórias e a atividade de células mononucleares, existindo potencialmente um mecanismo de “feedback” que afeta sua própria indução, assim como de outras citocinas que participam da resposta de fase aguda “in vivo”.

As APPs respondem a estímulos (infecção, inflamação ou trauma) de maneira diferente entre as espécies (CONNER, 1988; ECKERSALL, 1996; ENGLER, 1995; MURATA, 2004; SKINNER, 2001). As principais funções das APPs dependem da interação dessas proteínas com ligantes de várias origens, originando complexos “proteína-ligantes” que são removidos pelos RES ou por hepatócitos. Dessa forma, pode ocorrer inibição de proteases, neutralização de moléculas tóxicas (tais como: hemoglobina ou ânion superóxido), eliminação de membranas celulares e cromatina (ENGLER, 1995). A diminuição da concentração plasmática das APPs negativas durante uma reação inflamatória leva a um aumento de ligantes livres (ácidos graxos, hormônios, vitaminas). A interleucina-6 (IL-6) foi reconhecida como a principal reguladora da maioria dos genes de APPs; a resposta de célula hepática à IL-6 é caracterizada pelo aumento de produção da IL-6 tipo 2 ou também chamadas de APPs IL6 – específicas.

A concentração circulante dessas proteínas está relacionada com a severidade da condição primária e, portanto a quantificação de sua concentração é uma forma de avaliar a presença e extensão do fator causados do processo. Na medicina humana, e cada vez mais na medicina veterinária, a determinação da concentração plasmática dessas proteínas proporciona importante informação clínica sobre as lesões inflamatórias e infecciosas (GRUYS et al., 1993; GRUYS et al., 1994; THOMPSON et al., 1992). O perfil protéico inflamatório, incluindo o ensaio para: proteína C reativa, haptoglobina e glicoproteína ácida alfa 1, produz uma ferramenta biológica ao clínico para monitorar uma resposta inflamatória.

Animais que sofreram desafio, externo ou interno, ao seu estado de saúde, reagem com uma vigorosa resposta, que inclui a ativação de mecanismos imunológicos adquiridos e inatos. A resposta imune inata participa da defesa do hospedeiro, não depende de resposta específica, como a produção de anticorpos e

não apenas estimula a atividade leucocitária, mas também afeta os processos metabólicos do hospedeiro. As variadas reações à infecção, inflamação ou trauma, são conhecidas como “resposta de fase aguda” e inclui uma grande variedade de respostas patofisiológicas tais como a pirexia, leucocitose, alterações hormonais e depleção de proteínas musculares (JOHNSON, 1997). Agem minimizando o dano e intensificando o reparo tecidual. Outra resposta sistêmica é a produção de proteínas plasmáticas pelo fígado, conhecidas como “proteínas de fase aguda” (ECKERSALL; CONNER, 1988; BAUMANN; GAUDIE, 1990; MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2002; WHICHER; WESTACOTT, 1992;).

Murata et. al. (2004) referem, que nas 2 últimas décadas, tem-se obtido muitos avanços no monitoramento das APPs em animais de companhia, de produção e trabalho, tanto para fins clínicos como para experimentais.

Apesar da concentração sérica de proteínas de fase aguda serem rotineiramente relacionadas a contextos patológicos, não tem sido feitos muitos esforços para elucidar as concentrações fisiológicas das APPs (KURIBAYASHI et al, 2003). Ademais, alguns pesquisadores tem relatado sobre as mudanças na concentração das APPs durante a gestação, tanto em humanos quanto em cães (ECKERSALL et al., 1993; NIELSEN et al., 1990)

O aumento na concentração sérica de proteínas de fase aguda relacionado ao início da gestação é de interesse não apenas para sua possível utilização em testes de gravidez, como também para o estabelecimento de possíveis inter-relações fisiológicas (CONCANNON et al., 2001). Em algumas cadelas, os aumentos nas concentrações de relaxina sérica e de prolactina parecem ocorrer posteriormente às proteínas de fase aguda séricas, incluindo o fibrinogênio nos dias 26 a 30 e a proteína C-reativa nos dias 22 a 30 (ECKERSALL et al., 1993).

Eckersall et. al. (1993) afirmaram que uma resposta de fase aguda é identificada durante o terço médio da gestação em cadelas por determinação de concentração sérica de proteína C reativa (CRP), existindo um segundo aumento após o parto. Não foram observados aumentos da CRP em cadelas que não foram acasaladas ou em cadelas acasaladas, mas que não ficaram gestantes.

Vannucchi et al. (2002) realizaram um estudo com o objetivo de verificar as variações do perfil de proteínas de fase aguda, como consequência de reação inflamatória generalizada causada por invasão embriológica endometrial e utilizar tais variações como possível diagnóstico precoce de gestação. Também

relacionaram estado hormonal (progesterona e estradiol) com concentrações de proteínas de fase aguda (fibrinogênio, haptoglobulina, seromucóides, glicoproteína e α 2 globulina). Não foi encontrada relação entre locais de implantação formados (número de filhotes) e o estímulo hepático para a produção de proteínas de fase aguda. Concluíram que as proteínas de fase aguda podem ser usadas como teste para diagnóstico precoce de gestação a partir da 3ª semana (14º - 21º dia pós concentração plasmática máxima de LH) para ceruloplasmina (valores acima de 12,76 +/- 5,29 U/l), da 4ª semana (21º - 28º dia pós concentração plasmática máxima de LH) para glicoproteína (valores acima de 13,67%) e da 4ª semana de gestação (21º - 28º dia pós concentração plasmática máxima de LH) para α 2 globulina (valores acima de 0,61 g/dl). O fibrinogênio e o seromucóide aumentaram da 5ª a 6ª semana, respectivamente, não sendo, então, adequado como parâmetro para diagnóstico precoce da gestação.

Martinez-Subiela e Cerón (2002) referem valores de referência para concentrações de haptoglobina e proteína C reativa, em cães saudáveis. Para tanto utilizaram os kits comerciais Phase Haptoglobin Assay[®], Phase Canine C – Reactive Protein Assay[®]. Os valores obtidos variaram entre $0,2 \pm 0,14$ g/L e $1,56 \pm 0,56$ g/L para haptoglobina e entre $0,2 \pm 0,41$ mg/L e $1,89 \pm 2,30$ mg/L para proteína C reativa.

2.5.1 Proteína C Reativa (CRP)

A CRP é uma típica representante das proteínas de fase aguda, a dinâmica de sua concentração durante uma doença tem sido bem descrita, e é reconhecida como um dos itens de exame clínico essenciais em medicina humana (YAMAMOTO, et al., 2003).

No homem, a CRP tem sido considerada como um parâmetro confiável para diferenciação entre infecções de causa viral e bacteriana, por exemplo: meningite bacteriana resulta em uma elevação significativa da concentração sérica de CRP, enquanto que nenhuma modificação é encontrada em meningite viral (PELTOLA, 1982).

Entre as funções biológicas da CRP estão: modula a ativação de monócitos e macrófagos, estimula a produção de citocinas, liga-se à cromatina e previne a migração de neutrófilos teciduais. A concentração sérica de CRP aumenta em estágios iniciais da infecção, antes mesmo da observação da elevação da temperatura retal (PETERSEN, et al., 2004).

As mudanças nas concentrações séricas de CRP canina tem sido associadas às mudanças em condições patológicas; assim como a CRP humana, a CRP canina aumenta muito durante uma pneumonia (YAMAMOTO et al., 1994 e YAMAMOTO et al., 1994), trauma cirúrgico (CAPSI et al., 1984; CAPSI et al., 1987 e YAMAMOTO et al., 2003) e várias outras desordens inflamatórias (CONNER et al., 1988; MAURY, 1989; YAMASHITA et al., 1994). Estudos sobre as concentrações fisiológicas da CRP em cães são escassos.

Yamamoto et al., em 2003, mensuraram os níveis séricos de proteína C-reativa em cães da raça Beagle de várias idades, ambos os sexos e também gestantes, pelo método ELISA. As concentrações encontradas foram: 1,5 a 16 µg/ml (média = 7,9 +/- 3,4 µg/ml) em machos e 1,8 a 18,9 µg/ml (média = 8,3 +/- 4 µg/ml) em fêmeas, sendo que não houve diferenças significativas com relação ao sexo ou à idade. Mas mostrou-se significativamente aumentada durante a gestação, encontraram concentrações de 70,2 a 90,4 µg/ml (média = 77,5 +/- 7,1 µg/ml), aos 30 ou 45 dias após a ovulação, demonstrando 2 aspectos característicos da mudança na concentração de proteína C-reativa em cadelas gestantes. Sugeriram ainda que o aumento na concentração de CRP durante a gestação ocorria devido à influência de hormônios endócrinos.

Concannon et al., em 1996, objetivaram determinar as mudanças relacionadas à gestação das concentrações de fibrinogênio plasmático, relaxina sérica e a imuno-reatividade da Proteína C Reativa “like” (CRP-LI) sérica em cadelas gestantes e não gestantes. Concluíram que as concentrações de fibrinogênio, uma proteína de fase aguda, aumentam após o dia 20 da implantação em cães, isto é, concomitante ou justo antes do aumento gestação-específico das concentrações de relaxina dos dias 26 a 30, persistindo até o dia 50 e que o ensaio de fibrinogênio pode útil para o diagnóstico de gestação em cadelas.

Matijatko e Cerón (2006)¹ utilizaram o kit comercial Phase Canine C – Reactive Protein Assay[®] para determinar as concentrações séricas de CRP em cães saudáveis e infectados por *Babesia canis*. Os valores obtidos foram ilustrados

em um gráfico “box-plot”. Para cães saudáveis, as concentrações de CRP permaneceram por volta de 6 a 7 µg/ml e os infectados apresentaram valores entre 130 e 215 µg/ml.

2.3.2 Haptoglobina (Hp)

A haptoglobina é uma α_2 -globulina com um peso molecular de aproximadamente 125 kDA, foi primeiramente descrita como uma proteína com a capacidade de aumentar a estabilidade da atividade de peroxidase da hemoglobina, quando o pH é baixo (PETERSEN et al., 2004).

Quanto às funções biológicas da haptoglobina, várias delas têm sido citadas: ligante de hemoglobina, efeito bacteriostático, estimulação de angiogênese, participação no metabolismo de lipídios, desenvolvimento de fígado gorduroso em bovinos, efeito imunomodulatório (PETERSEN et al., 2004). Mas a principal função desta proteína é prevenir a perda de ferro pela formação de complexos estáveis com a hemoglobina livre no sangue, como foi firmado por Petersen et al. (2004 apud KNEE; JANDL, 1965. p. 710 e LAURELL; NYMANN, 1975. p. 499)¹

O valor de referência para Hp citado por Solter et al., (1991), em cães sadios, é de 5,6 mg/ml de capacidade ligante de HbCN, mas Harvey (1976) afirmou que o valor médio é de 10,4 mg/ml de capacidade ligante de HbCN e para condições inflamatórias as concentrações de Hp podem alcançar 40 mg/ml HbCN).

A concentração sérica de Hp pode ser influenciada por outros fatores que não uma resposta de fase aguda. Níveis aumentados de hemoglobina no soro são seguidos de concentrações diminuídas de Hp. Em bovinos, durante uma crise hemolítica aguda (BREMNER, 1964) e em eqüinos com hematomas pós-cirúrgicos (KENT; GOODALL, 1991), a Hp não foi detectada na circulação sanguínea. Além da resposta de fase aguda, doença renal e icterícia obstrutiva, podem causar hiperhaptoglobinemia. Foram observados também efeitos de redução de haptoglobina em amostras de soro com hemoglobina livre (PETERSEN et al., 2001).

¹ PETERSEN, H. H. et al. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Vet Res.** v. 35, p. 170, 2004.

McGrotty e Eckersall (2003) mensuraram Hp, por meio de ensaio bioquímico automático baseado na ligação hemoglobina-haptoglobina, em cães saudáveis e não gestantes e em outros portadores de diversas patologias. Obtiveram os seguintes valores médios: cães saudáveis – 0,2 g/l, hiperadrenocorticism – 4,9 g/l; doenças imuno-mediadas – 3,32 g/l e neoplasias – 5,5 g/l.

2.3.3 Glicoproteína ácida $\alpha 1$ (GA $\alpha 1$)

A glicoproteína ácida $\alpha 1$, também chamada de orosomucóide, (COOPER; WARD, 1979), corresponde a uma molécula de peso molecular de 41 a 43 kDa e possui propriedades de potencial significado fisiológico, tais como: efeitos imunomodulatórios e ligar-se a drogas e a hormônios esteróides (FOURNIER et al., 2000).

A GA $\alpha 1$ é considerada como um anti-inflamatório natural e um agente imunomodulatório pois possui atividades anti-neutrófilicas e anti-complemento. Também foi relatado que esta proteína auxilia na manutenção da permeabilidade capilar, provavelmente aumentando a seletividade de carga aniônica da barreira endotelial, deste modo desempenhando um papel crucial na manutenção da homeostase (FOURNIER et al., 2000).

Em humanos e ratos, entre as proteínas séricas, ligantes de drogas e outras moléculas, de maiores implicações farmacocinéticas, estão a albumina, a lipoproteína e a GA $\alpha 1$. Portanto, a eficácia e a toxicidade de algumas drogas podem ser afetadas por alterações nos níveis séricos de GA $\alpha 1$, secundárias a várias doenças (FOURNIER et al., 2000).

Kuribayashi et al. (2003) mensurou a GA $\alpha 1$ sérica em cães da raça beagle de ambos os sexos, de várias idades e também em cadelas gestantes. Constataram que nestas últimas a GA $\alpha 1$ variou de 250 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ ($634 \pm 246 \mu\text{g/ml}$), com níveis máximos no 45º dia após o pico de LH. O valor médio encontrado em cadelas gestantes foi aproximadamente o dobro da média observada em cães saudáveis e não gestantes.

3. Material e Método

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 ANIMAIS E GRUPOS DE ESTUDO

Neste estudo foram utilizadas 13 cadelas da raça Boxer, sendo 2 primíparas, 7 multíparas e 4 nulíparas, com idades variando de 1 ano e 3 meses a 10 anos, acasaladas com cães da mesma raça, em datas conhecidas. Os machos utilizados, 4 cães, tiveram seu sêmen avaliado e foram considerados normais, segundo resultado do espermograma.

Os animais são provenientes de 3 canis particulares, especializados na criação de cães da raça Boxer:

- Canil Decesario, de propriedade de Monique Rodrigues Cesário Silva, localizado em Guaratinguetá – SP.
- Canil Auca Domus, de propriedade de Adriana Helena de Almeida, localizado em Carapicuíba – SP.

Os proprietários dos canis referidos acima estavam cientes do protocolo experimental, concordaram e autorizaram, por escrito, a utilização de seus cães neste estudo.

Antes de incluir os animais nos grupos experimentais, todos eles passaram por avaliação clínica geral com exames como hemograma, glicemia, função hepática, função renal, protoparasitológico e pesquisa de hemoparasitas. Foram vermifugados a cada três meses conforme rotina do canil e testados para brucelose previamente ao início do experimento, confirmando que os animais estavam negativos para a doença.

O experimento foi conduzido nas instalações do canil Auca Domus, em Carapicuíba – SP, onde todos os animais participantes foram alojados 1 mês antes do início das coletas de sangue, com a finalidade de serem habituados ao manejo e à rotina praticados no local. De modo que todas as cadelas foram submetidas às mesmas condições sanitárias e alimentares durante o período experimental.

As cadelas foram incluídas em dois grupos:

- Grupo experimental ou gestante (G), constituído de 9 cadelas
- Grupo controle ou não gestante (NG), constituído de 5 cadelas

Os animais foram incluídos em apenas um grupo de estudo, com exceção de uma delas, a qual participou dos dois grupos, durante a gestação, no grupo gestante (G) e no ciclo estral seguinte, quando não foi acasalado, no grupo não gestante. De modo que as cadelas que acasalaram, mas não ficaram gestantes ou tiveram reabsorção embrionária, foram excluídas do estudo.

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Para a realização do estudo, preconizou-se coletas de sangue a partir do proestro até o início do estro, diariamente, seguidas de duas coletas semanais até o fim do diestro (grupo NG) ou fim da gestação (grupo G). O ciclo estral foi acompanhado por meio de exames de citologia vaginal e dosagens de progesterona sérica. Foram realizados esfregaços vaginais a partir da detecção visual dos primeiros sintomas de proestro, com uma frequência mínima de 3 vezes por semana, a fim de observar o comportamento das células do epitélio e estimar, tanto o melhor período para a realização do acasalamento, quanto o início e fim do diestro.

A coleta do material para o exame de citologia vaginal, foi feita introduzindo-se um “swab” de Rayon – INLAB[®] na vagina no sentido crânio-dorsal até a porção mais cranial da mesma, de onde foram retiradas as amostras do epitélio. As células foram depositadas sobre uma lâmina para microscopia - INLAB[®], e então coradas com conjunto para coloração “Panótico Rápido” - LABORCLIN[®].

O sangue foi coletado por meio de punção da veia cefálica esquerda ou direita, utilizando-se seringas de 10 ml e agulhas 25 X 7mm, ambas estéreis e descartáveis. As amostras de sangue coletadas foram imediatamente centrifugadas a 1500 G, por 10 minutos. O soro obtido foi separado por aspiração com auxílio de pipetas plásticas, armazenado em microtubos plásticos, do tipo eppendorf, com capacidade de 1,5 ml e acondicionado em congelador a -40°C até o processamento.

Cada amostra de soro foi separada em 4 alíquotas, a saber: para dosagem de proteína C reativa, de haptoglobina, de glicoproteína ácida $\alpha 1$ e para determinação da concentração sérica de progesterona.

O início do estro e o dia da ovulação foram determinados segundo as concentrações séricas de progesterona (CONCANNON et al., 1983).

3.3 EXAMES ULTRA-SONOGRÁFICOS

Os exames ultra-sonográficos foram realizados de 2 a 3 vezes por semana, a partir do 18º dia da gestação até o dia do parto, com um aparelho portátil da marca GE®, modelo Logic α 100 MP, equipado com um transdutor convexo de 5,0 MHz e outro linear de 7,5 MHz. As imagens obtidas a partir dos exames foram impressas e documentadas por meio de uma vídeo-impressora da marca Sony®, modelo UP890MD e papel térmico da mesma marca, modelo UPP-110HG.

Os exames ultra-sonográficos foram realizados com o animal em decúbito dorsal ou lateral e as regiões abdominal ventral e lateral tricotomizadas (máquina de tosa de 1 velocidade, da marca Oster® e modelo Golden A5, e lâmina número 10), sem sedação e acompanhado pelo proprietário. O transdutor linear de 7,5 MHz foi utilizado em todos os exames, enquanto que o transdutor setorial de 5 MHz foi útil a partir do exame em que o CCR ultrapassa os limites da placenta zonária, para avaliar o corpo fetal em seu comprimento, e nos 2 últimos exames para que fosse possível a observação adequada de estruturas com dimensões muito grandes, tais como as dimensões do corpo fetal (DC, PC e AC). Foi aplicado gel solúvel em água Aquasonic 100, da marca Parker®, para diminuir a quantidade de ar e melhorar o contato entre o transdutor e a pele do animal.

Foram mensuradas, em milímetros, as seguintes variáveis:

diâmetro transversal do concepto (DTC)

espessura da placenta (EP)

largura da placenta (LP)

diâmetro biparietal (DBP)

diâmetro do corpo (DC)

comprimento do corpo (CCR)

Sempre que possível, foram observados 2 conceitos de cada gestação e preferivelmente 1 de cada corno uterino, em cada exame.

A gestação foi detectada a partir da visualização de estruturas esféricas anecóicas no interior do útero, consideradas como sendo sacos gestacionais ou conceitos. Nesta ocasião mensurou-se o diâmetro do conceito em secção transversal (DTC), tal variável foi calculada a partir da média aritmética das distâncias dorso-ventral e látero-lateral desta estrutura, devido ao fato do formato da secção transversal do conceito não ser necessariamente circular.

A partir desta fase as outras estruturas foram examinadas conforme foram surgindo, a placenta foi considerada como a camada mais interna da parede uterina no local de implantação do conceito e sua espessura (EP) foi mensurada, em secção sagital, em sua maior dimensão (Figura 4).

Antes da identificação da placenta zonária anular, a mensuração da largura da placenta (LP) foi feita considerando o comprimento longitudinal da vesícula embrionária (conceito) em secção sagital. Após este período, a própria largura da placenta zonária foi mensurada por meio de uma linha reta entre suas extremidades.

A cabeça fetal foi mensurada a partir de quando se apresentou distinguível do corpo e foi abordada em sua distância ou diâmetro biparietal (DBP).

O corpo fetal foi mensurado, em secção mediana, na sua maior dimensão, até quando da primeira visualização do estômago. Deste momento em diante o diâmetro do corpo (DC) teve sua medida determinada, em sua maior secção transversal, na região onde fígado e do estômago fetais são encontrados.

O comprimento Crown-Rump (CCR) foi mensurado a partir do momento em que foi possível a visualização do embrião. Esta medida foi obtida, em secção dorsal do embrião, por meio de uma linha reta entre as extremidades cranial e caudal enquanto a cauda não foi evidenciada. Nas fases seguintes o CCR foi obtido a partir da distância entre o ponto mais rostral do crânio até a base da cauda. (Figura 6).

A gestação foi dividida em 9 semanas. As duas primeiras não apresentam estruturas evidenciáveis pela ultra-sonografia, a partir da terceira semana de gestação, além das mensurações das estruturas mencionadas acima, foi observada a cronologia do aparecimento ou aspectos ultra-sonográficos das seguintes estruturas:

- batimentos cardíacos
- cabeça diferenciada do corpo fetal
- brotos dos membros
- comprimento do corpo maior que a largura da placenta
- movimentos fetais
- estômago
- bexiga
- desaparecimento do saco vitelínico
- rins
- mineralização do esqueleto fetal: cabeça, coluna vertebral e pelve.
- individualização de alças intestinais.

3.4 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE HAPTOGLOBINA, PROTEÍNA C REATIVA E GLICOPROTEÍNA ÁCIDA α 1.

A determinação das concentrações séricas de haptoglobina, proteína C reativa e glicoproteína ácida α 1 foi realizada utilizando-se *kits* comerciais, de fabricação irlandesa, denominados Phase Haptoglobin Assay[®], Phase Canine C – Reactive Protein Assay[®], Canine α 1 Acid Glycoprotein measurement kit[®], Tridelta Development Limited.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Ornitopatologia, do Departamento de Patologia (VPT) e no Laboratório de Técnicas Imunológicas Aplicadas à Morfofisiologia (LTIAM - VCI) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

3.4.4 Ensaio de haptoglobina (HP)

Este ensaio não é específico para a espécie canina, mas é indicado para dosagem de haptoglobina em uma grande variedade de espécies, entre elas: humanos, camundongos, ratos, bovinos, felinos, caninos, suínos, ovinos, caprinos, eqüinos, coelhos, símios e outros.

O método do ensaio é colorimétrico. Hemoglobina livre apresenta atividade peroxidativa, a qual é inibida em pH baixo. A haptoglobina presente no soro liga-se à hemoglobina e em pH baixo, preserva a atividade da peroxidase da hemoglobina conjugada. A preservação da atividade da peroxidase da hemoglobina é diretamente proporcional à quantidade de haptoglobina presente no soro.

A metodologia utilizada para o processamento das amostras foi a sugerida pelo fabricante do *kit*, porém efetuando-se as seguintes modificações:

a) As amostras de soro foram descongeladas e diluídas, com o diluente indicado pelo *kit* na proporção de 1:2 para o grupo NG e para as amostras das três primeiras semanas de gestação do grupo G. Para as amostras da quarta à nona semanas de gestação, no grupo G, utilizou-se diluição na proporção 1:7. Estas concentrações de soro foram utilizadas com a finalidade de ajustar as densidades ópticas obtidas com as da curva padrão. O soro foi descongelado apenas uma vez.

b) À placa de fundo chato, foi adicionado 100 µl de reagente 1 (hemoglobina estabilizada e diluidor de hemoglobina 1:1) a cada um dos poços, em seguida foi adicionado 7,5 µl das amostras de soro diluído e das diluições da curva padrão, ambas em duplicata.

3.4.5 Ensaio de proteína C reativa (CRP)

A dosagem de CRP foi realizada por meio de kit de ensaio imunoenzimático ELISA específico para cães, sendo este um ELISA com anticorpo de captura.

A reação procedeu-se conforme as indicações do fabricante. Em placa de fundo chato recoberto com anticorpo monoclonal específico para CRP canina, já bloqueada, adicionou-se os padrões de concentrações conhecidas de CRP e as

amostras de soros diluídos conforme a indicação do kit. Após o período de incubação e do processo de lavagem, adicionou-se em cada poço o anticorpo monoclonal anti-CRP canina. A placa foi novamente incubada e lavada. Acrescentou-se a solução de substrato e após 15 minutos de reação, esta foi interrompida com a solução bloqueadora. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (modelo - μ Quant, Bio-tec Instruments, INC; software: KC4 - Kinetcalc for windows, versão: 3.0), em comprimento de onda de 450 nm. As densidades ópticas obtidas foram analisadas em papel semi-logaritmo, usando a curva padrão. A intensidade de cor produzida é proporcional à concentração de CRP presente no soro analisado.

3.4.6 Ensaio de glicoproteína ácida α 1 canina (GA α 1)

O kit para a dosagem de GA α 1 utiliza a reação de precipitação radial simples para a detecção desta proteína. Em placa de gel de ágar contendo anticorpo monoclonal específico para a glicoproteína ácida α 1, acrescenta-se os soros testes e os padrões de concentração conhecida de GA α 1. As amostras difundem-se no agar e a GA α 1 liga-se ao anticorpo específico ocorrendo uma reação de precipitação, é possível observar esta reação macroscopicamente porque ocorre a formação de um anel ao redor do poço contendo a amostra.

O diâmetro do anel é diretamente proporcional à concentração de GA α 1 canina presente da amostra de soro testada. Desta forma, o resultado obtido é comparado com as concentrações dos padrões, após se estabelecer uma curva em papel semi-logaritmo.

3.5 DOSAGEM HORMONAL DE PROGESTERONA SÉRICA

As concentrações séricas de progesterona foram realizadas utilizando-se técnica comercial de radiomunoensaio (RIE), por método de quantificação em fase sólida, com base da competição do hormônio marcado com radioatividade (Progesterone Coat-a-Count – DPC) os valores foram expressos em ng/ml, após

conversão, com auxílio da curva de calibração preparada conjuntamente.

A partir deste resultado, o dia em que o LH apresentou-se em níveis plasmáticos máximos (dia 0 da gestação) foi considerado aquele em que a concentração de progesterona atingiu concentração igual ou maior que 2,0 ng/ml.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi feita a análise descritiva de todas as variáveis do estudo. As variáveis quantitativas foram apresentadas em termos de seus valores de tendência central e de dispersão.

A homogeneidade das variâncias e a aderência à curva normal foram verificadas pelos testes de Levene e Kolmogorov-Smirnov, respectivamente. Para as variáveis que apresentavam estes dois princípios satisfeitos foram utilizados testes paramétricos e caso contrário fez-se uso de testes não paramétricos.

Para se comparar o grupo de grávidas com não grávidas foi utilizado o teste U de Mann-Whitney. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para se verificar o padrão das variáveis por semana de gestação.

Foi utilizada a Análise de Variância de medidas repetidas (ANOVA) para se comparar os grupos e as medidas (CRP, GA α 1 e Hp), seguido do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls.

4. Resultados

4 RESULTADOS

4.1 DETECÇÃO E APARÊNCIA ULTRA-SONOGRÁFICAS DAS ESTRUTURAS ESTUDADAS NA GESTAÇÃO

A detecção e aparência ultra-sonográficas das estruturas estudadas na gestação estão descritas nos itens abaixo.

4.1.1 Duração da Gestação e Número de Filhotes por Ninhada

A duração da gestação, baseada no dia do pico de LH (dia 0 da gestação), variou entre 63 a 66 dias, com uma média de 65 ± 1 dia. O número de filhotes nascidos (incluindo os natimortos), por ninhada, variou de 02 a 09 sendo a média de 6,1 filhotes e um total de 55.

Entre as cadelas primíparas o número de filhotes por ninhada foi de $7,0 \pm 2,8$, a duração da gestação foi de $64 \pm 1,41$ dias. E para as múltiparas observou-se que o número de filhotes foi de $6,0 \pm 2,16$ e a gestação durou, em média, $65,3 \pm 0,75$ dias. Tanto para a duração da gestação, quanto para o número de filhotes, foi constatado que os dados têm distribuição normal e que a diferença entre as médias não foi significativa.

4.1.2. Terceira semana de gestação (15º ao 21º dia)

Os primeiros exames ultra-sonográficos foram realizados entre 18 e 21 dias de gestação, com o animal apresentando a vesícula urinária moderadamente repleta, com a finalidade de otimizar a observação do corpo do útero, o qual está localizado entre o cólon dorsalmente e à bexiga ventralmente, apresentando-se relativamente hipoecóico (Figura 1).

Do 18º ao 23º dias, foi observada a primeira evidência de gestação, e consta da visualização de estruturas anaecóicas de formato esférico, com 2 mm de diâmetro (Figura 1). Tais vesículas foram consideradas como sendo conceitos (também chamados de blastocistos ou vesículas embrionárias).

4.1.3 Quarta semana de gestação (22º ao 28º dia)

Os eventos encontrados na 4ª semana de gestação estão descritos nas próximas duas sub-seções.

4.1.3.1 Placenta e Membranas Fetais

A placenta foi primeiro identificada do 22º dia de gestação, com $1,0 \pm 0,0$ mm de espessura (Tabela 3). Esta estrutura foi identificada como uma formação hiperecótica, que constitui a parede de cada vesícula embrionária (Figura 2). Com o decorrer da quarta semana, a placenta apresentou-se tipicamente zonária, por volta do 27º ao 29º dia de gestação como uma estrutura cilíndrica, com as margens aumentadas de volume, caracterizando o hematoma marginal (Figura 3).

O saco vitelino (SV) foi notado do 20º ao 24º dias de gestação como sendo a área hipoecótica no interior do conceito (Figura 2), tanto em secção mediana quanto transversal.

4.1.3.2 Embrião

Os batimentos cardíacos foram percebidos entre o 20º e o 24º dia de gestação e o embrião apresentou-se visível, com contornos definidos, do 22º ao 24º (Figura 2), quando foram tomadas as primeiras medidas DC. A secção transversal do corpo, neste período, foi considerada como sendo circular até o estômago fetal

ser detectado. Deste modo, aferiu-se o diâmetro do corpo, obtendo-se um valor médio de $2,27 \pm 1,09$ mm (Gráfico 1 e Tabela 1).

O DBP também pode ser mensurado a partir do 26º dia de gestação, ou seja, final da 4ª semana, quando foi possível individualizar a cabeça e o corpo do embrião, quando mediu $1,23 \pm 1,09$ mm (Gráfico 2 e Tabela 2).

4.1.4 Quinta semana de gestação (29º ao 35º dia)

Os eventos encontrados na 5ª semana de gestação estão descritos nas próximas duas sub-seções.

4.1.4.1 Placenta e Membranas Fetais

O âmnio foi primeiro observado dos 30º ao 33º de gestação como uma membrana hiperecótica que envolve o embrião e continuou visível até o último exame antes do parto (Figura 4).

Do 28º ao 31º dia de gestação, o SV apresentou-se, na secção transversal do concepto, como uma membrana hiperecótica linear e do 31º ao 33º dia começou a mostrar-se, em secção sagital, como duas linhas paralelas que vão de um extremo ao outro do concepto (Figura 3), e em secção transversal, como uma vesícula com limites hiperecóticos e moderadamente enrugada, daí em diante apresentou-se cada vez menor e mais pregueada (Figura 5).

Neste período, a placenta zonária apresentou-se com $2,5 \pm 0,49$ mm de espessura (Gráfico 3 e Tabela 3) e o feto permaneceu circunscrito na largura deste órgão.

4.1.4.3 Feto

Os brotos dos membros torácicos e pélvicos foram detectados do 30º ao 34º dias de gestação (Figura 6). O aparecimento de áreas hiperecóticas, do 32º ao 37º na região da cabeça fetal, costelas e coluna vertebral foi considerado como sendo o início da ossificação, tais regiões foram aumentando em extensão e intensidade até o fim da gestação evidenciando progressivamente o esqueleto fetal.

Na 5ª semana de gestação, o CCR foi aferido e apresentou-se com $20,39 \pm 6,37$ mm e ainda menor que a largura da placenta. O DBP atingiu uma média de $6,35 \pm 1,68$ mm (Gráfico 2 e Tabela 2) e o DC, $6,94 \pm 1,84$ mm (Gráfico 1 e Tabela 1).

4.1.5 Sexta semana de gestação (36º ao 42º dia)

Os eventos encontrados na 6ª semana de gestação estão descritos nas próximas duas sub-seções.

4.1.5.1 Placenta e Membranas Fetais

O último exame ultra-sonográfico em que o corpo do embrião permaneceu inscrito nos limites da placenta zonária ocorreu do 36º ao 39º dia, quando mediu $36,11 \pm 4,04$ mm e o primeiro exame em que o comprimento do corpo fetal apresentou-se maior que a largura da placenta ocorreu entre o 39º e o 42º dia com $55,3 \pm 3,58$ mm. Neste período a EP foi aferida com $3,89 \pm 0,9$ mm (Gráfico 3 e Tabela 3).

4.1.5.2 Feto

A sexta semana de gestação é marcada pela identificação do estômago fetal (Figura 4). A partir deste momento, o parâmetro DC foi obtido da secção transversal do corpo fetal passando pelo estômago e pelo fígado fetais (Figura 7), medindo $15,17 \pm 3,88$ mm (Gráfico 1 e Tabela 1).

A bexiga evidenciou-se pouco antes do estômago fetal, como uma vesícula anaecóica na parte caudal do abdome fetal, do 35^o ao 39^o dia de gestação.

Além da observação dos rins fetais (Figura 8), foi também neste período que se verificou a mineralização progressiva mais intensa dos ossos fetais (cabeça, vértebras e costelas), o que prejudicou a qualidade da imagem ultra-sonográfica devido à formação de sombra acústica.

4.1.6 Sétima semana de gestação (43^o ao 49^o dia)

Os eventos encontrados na 7^a semana de gestação estão descritos nas próximas duas sub-seções.

4.1.6.1 Placenta e Membranas Fetais

A partir do 44^o ao 48^o dia de gestação não foi mais possível a visualização do SV por meio do exame ultra-sonográfico. A EP apresentou-se com $6,31 \pm 1,04$ mm (Gráfico 3 e Tabela 3).

4.1.8.2 Feto

Foi neste período que se observou a ossificação da pelve fetal, além da identificação do cordão umbilical a partir 43º ao 46º dia. O DBP foi aferido em $16,9 \pm 1,66$ mm (Gráfico 2 e Tabela 2) e o DC em $27,8 \pm 4,01$ mm (Gráfico 1 e Tabela 1).

4.1.9 Oitava semana de gestação (50º ao 56º dia)

Na 8ª semana de gestação foi possível individualizar as alças intestinais do feto (Figura 10), porém não se observou peristaltismo. As mensurações da EP, do DBP e do DC foram: $7,36 \pm 0,77$ mm (Tabela 3), $20,19 \pm 1,6$ mm (Tabela 2) e $40,33 \pm 5,15$ mm (Tabela 1), respectivamente.

4.1.10 Nona semana de gestação (57º ao 63º dia) até o parto (65º $\pm$ 1 dia)

No final deste período, 62º a 65º dia, notou-se movimentos peristálticos intestinais e diminuição da frequência cardíaca fetais. Tais características denunciam a proximidade do parto.

As mensurações realizadas na 9ª semana foram: EP = $8,22 \pm 1,12$ mm (Tabela 3), DBP = $24,89 \pm 1,63$ mm (Tabela 2) e DC = $53,27 \pm 5,52$ mm (Tabela 1). E na 10ª semana: DBP = $27,75 \pm 0,35$ mm (Tabela 2) e DC = $59,25 \pm 2,47$ mm (Tabela 1).

Gráfico 1 – Box-Plot das mensurações do diâmetro do corpo (DC) e idade gestacional, com representação da média, desvio padrão e valores máximo e mínimo – São Paulo – 2006

Gráfico 2 – Box-Plot das mensurações do diâmetro biparietal (DBP) e idade gestacional, com representação da média, desvio padrão e valores máximo e mínimo – São Paulo – 2006

Gráfico 3 – Box-Plot das mensurações da espessura da placenta (EP) e idade gestacional, com representação da media, desvio padrão e valores máximo e mínimo– São Paulo – 2006

Figura 1 – Imagem ultra-sonográfica de gestação no 20º dia de gestação. Animal posicionado em decúbito lateral, a bexiga (B) apresenta-se como um área relativamente anaecóica. Observa-se também em secção mediana, o corpo do útero (U) hipoeecóico e a primeira verificação do conceito (C) como estrutura esférica anaecóica, em seu interior

Figura 2 – Imagem ultra-sonográfica de gestação no 24º dia, demonstrando a placenta (#) como uma formação hiperecótica constituindo a parede da vesícula embrionária e em seu interior, uma massa também hiperecótica, representando o embrião (*) em secção dorsal. O DC foi aferido em sua maior dimensão transversal (+)

Figura 3 – Imagem ultra-sonográfica de gestação no 36º dia, demonstrando a placenta zonária (PZ), em secção sagital. Um aumento de volume nas extremidades da placenta, caracteriza o hematoma marginal (*). Observa-se também o feto (F) circunscrito nos limites da PZ e o saco vitelínico (SV), também em secção sagital, como 2 linhas hiperecóticas, paralelas e moderadamente enrugadas, que vão de um extremo ao outro do concepto

Figura 4 – Imagem ultra-sonográfica de gestação no 36º dia. O feto encontra-se em secção dorsal, onde pode-se notar a cabeça (c) nitidamente distinta do tronco (t) fetal e o saco amniótico (↷) como uma linha hiperecótica envolvendo o feto. As cabeças de setas sólidas indicam o CCR e a letra E refere-se ao estômago fetal representado por uma cavidade anaecótica. O DBP é mensurado entre os ossos parietais, como mostram as setas verticais

Figura 5 – Imagem ultra-sonográfica de gestação no 37º dia, ilustrando o conceito em secção transversal, evidenciando o saco vitelínico (SV) também em secção transversal, como uma vesícula de contornos hiperecóticos e moderadamente pregueada

Figura 6 – Imagem ultra-sonográfica de gestação no 31º dia, mostrando um feto em secção dorsal, evidenciando os brotos dos membros torácicos e pélvicos (*)

Figura 7 – Imagem ultra-sonográfica de gestação no 46º dia, ilustrando o corpo fetal em secção transversal, passando pelo estômago (E) e pelo fígado (F) fetais, com a finalidade de mensurar o DC

Figura 8 – Imagem ultra-sonográfica de gestação no 47º dia, mostrando o rim direito por meio da evidência de pelve renal dilatada, representada por uma área anaecóica no interior deste órgão. O estômago fetal está repleto e apontado pela letra E

Figura 9 – Imagem ultra-sonográfica de gestação no 46º dia, ilustrando o corpo fetal em secção transversal evidenciando cordão umbilical (U), em secção longitudinal

Figura 10 – Imagem ultra-sonográfica de gestação no 54º dia, mostrando o corpo fetal em secção dorsal de maneira a evidenciar os pulmões (p), o coração (c), o fígado (f), as alças intestinais individualizadas (i) e a bexiga (b) fetais

4.8 MENSURAÇÕES DOS PARÂMETROS GESTACIONAIS SELECIONADOS

Foram mensuradas estruturas embrionárias e fetais (diâmetro do corpo - DC e diâmetro biparietal - DBP), e a espessura da placenta – EP, sendo que em cada exame a mesma variável foi abordada, no mínimo, de 2 conceitos e preferencialmente, de cornos uterinos diferentes.

4.8.1 Diâmetro do corpo (DC)

O diâmetro do corpo do embrião foi mensurado da imagem em secção mediana, a partir do exame em que foi possível identificá-lo com contornos definidos, a partir do 22º ao 24º dia de gestação. Quando da identificação do estômago fetal, na 6ª semana de gestação (do 36º ao 39º dia), o DC foi obtido a partir da secção

transversal do corpo fetal, abrangendo o estômago e o fígado fetais. Tais medidas foram tomadas do 22º ao 65º dia (dia do parto) variando de $2,27 \pm 1,09$ mm a $59,25 \pm 2,47$ mm (Tabela 1).

A regressão linear univariada da variável DC em relação à idade gestacional resultou em um modelo altamente significativo ($p < 0,005$), com R^2 ajustado de 0,96.

Foi verificado há diferença estatisticamente significativa entre as semanas de gestação ($p < 0,001$).

Tabela 1 – Diâmetro do Corpo (DC) médio, por animal e por idade gestacional (em semanas), durante o período em que foi aferido – São Paulo – 2006

		DC									media	devio padrão
anim		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
S e m a n a s	4	2	2	3	2,5	2,5	4	1,625	1,5	1,5	2,27	1,09
	5	7,375	6,5	7	8,875	7,5	8,5	6,5	5,25	5,5	6,94	1,84
	6	12,63	11,38	14,75	18,5	16	18,38	13,88	11,88	14,13	15,17	3,88
	7	27,13	26	29,38	31,25	29,5	29,25	26,63	25,13	25,92	27,8	4,01
	8	40,75	44	40,13	40,63	45,13		38,5	38,38	35,13	40,33	5,15
	9		52,88	55,75	50,75	57		54,92	49,5	53	53,27	5,52
	10		57,5			61					59,25	2,47

Gráfico 4 – Dispersão entre o diâmetro do corpo (DC) médio e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo – 2006

4.2.2 Diâmetro Biparietal (DBP)

O DBP foi mensurado a partir do exame em que a cabeça apresentou-se diferenciada do corpo, a partir do fim da 4ª semana de gestação (26º dia) até o dia do parto e variou entre $2,23 \pm 1,09$ mm e $27,75 \pm 0,35$ mm (Tabela 2).

A regressão linear univariada da variável DBP em relação à idade gestacional resultou em um modelo altamente significativo ($p < 0,005$), com R^2 ajustado de 0,99 (Gráfico 5).

Foi verificado há diferença estatisticamente significativa entre as semanas de gestação ($p < 0,001$).

Tabela 2 – Diâmetro Biparietal (DBP) médio, por animal e por idade gestacional (em semanas), durante o período em que foi aferido – São Paulo – 2006

DBP (mm)												
animal		1	2	3	4	5	6	7	8	9	media	desvio padrão
s e m a n a s	4	2,00	2,00	3,00	2,50	2,50	4,00	1,38	1,50	1,50	2,23	1,09
	5	7,38	5,75	6,50	6,00	7,00	8,00	5,50	5,00	6,00	6,35	1,68
	6	10,25	11,00	10,75	12,50	11,50	13,25	11,25	9,50	10,50	11,17	1,52
	7	16,25	15,50	16,25	17,50	16,00	18,50	15,50	14,75	15,50	16,19	1,66
	8	20,25	20,00	20,75	22,00	20,50		19,38	19,25	19,38	20,19	1,6
	9		25,50	25,75	26,00	24,75		24,83	23,90	23,30	24,89	1,63
	10		27,50			28,00					27,75	0,35

Gráfico 5 – Dispersão entre o diâmetro biparietal (DBP) médio e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo – 2006

A espessura da placenta foi considerada, inicialmente, como sendo a espessura da própria parede do concepto, com o evoluir da gestação a placenta evidenciou-se e por volta de 26 dias de gestação tornou-se caracteristicamente zonária anular. Pôde ser aferida a partir da 4ª semana de gestação (22º dia em diante), com $1,56 \pm 0,50$ mm até a 9ª semana, medindo $8,22 \pm 1,12$ mm (Tabela 3).

A regressão linear univariada da variável EP em relação à idade gestacional resultou em um modelo altamente significativo ($p < 0,005$), com R^2 ajustado de 0,90 (Gráfico 6).

Foi verificado há diferença estatisticamente significativa entre as semanas de gestação ($p < 0,001$).

Tabela 3 – Espessura da Placenta (EP) média, por animal e por idade gestacional (em semanas), durante o período em que foi aferido – São Paulo – 2006

EP (mm)												
anim al		1	2	3	4	5	6	7	8	9	média	desvio padrão
s	4	1,75	2,00	2,00	1,50	2,00	1,50	1,50	1,00	1,50	1,56	0,5
e	5	3,00	2,25	2,75	3,00	2,50	2,50	2,00	2,00	2,50	2,5	0,49
n	6	4,00	4,00	3,50	4,50	4,25	5,00	3,25	3,00	3,50	3,89	0,9
a	7	7,25	7,00	5,75	7,25	6,88	6,50	5,75	5,38	5,13	6,31	1,04
n	8	7,50	8,00	7,25	8,50	7,75		6,50	6,50	6,88	7,36	0,77
a	9		9,25	8,75	8,75	9,50		7,50	6,92	7,50	8,22	1,12
s	10		9,00			9,00					9	0,0

Gráfico 6 – Dispersão entre a espessura da placenta (EP) média e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo – 2006

4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA SELECIONADAS

Os grupos G e NG não tiveram distribuição normal pelo teste Kolmogorov – Smirnov. Utilizou-se o teste U de Mann-Whitney para comparar os grupos G e NG e verificou-se que concentrações séricas das proteínas de fase aguda entre as semanas estudadas são diferentes ($p < 0,001$).

4.3.1 Haptoglobina (Hp)

Ao avaliar os valores médios semanais obtidos para Hp sérica no grupo G, observou-se um discreto aumento das concentrações entre a 1ª e a 3ª semanas de gestação. A partir da 4ª semana, houve um aumento abrupto nas concentrações séricas de Hp, existindo uma concentração máxima na 5ª semana ($11,11 \pm 1,7$ mg/ml), seguido de decréscimo até a 9ª semana ou parto (Tabela 4) (Gráfico 7 e

Gráfico 10). O teste ANOVA de medidas repetidas mostrou que há diferenças entre as semanas ($p < 0,001$), pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls pode-se observar que a 5ª e a 6ª semanas diferem significativamente das semanas 1, 2 e 3 ($p < 0,05$). O valor de referência médio das semanas de gestação foi de $6,94 \pm 4,07$ mg/ml.

Foram construídos gráficos de dispersão em 2 períodos diferentes da gestação, com representação da linha de tendência, equação da regressão e R^2 :

- da 1ª semana à 5ª semana, quando da concentração máxima de Hp (Gráfico 8).
- da 5ª semana até o parto (Gráfico 9).

O gráfico 11 representa a dispersão e a reta de regressão ($R^2 = 0,087$) entre os valores individuais máximos de haptoglobina e o número de filhotes nascidos por cadela e demonstra que somente 8,7% de variabilidade da amostra é explicada pela reta de regressão, ou seja, a concentração máxima de haptoglobina é pouco justificada pelo número de sítios de implantação embrionária.

No grupo NG, não foram observadas alterações significativas entre as concentrações médias durante as semanas correspondentes ao diestro ($p > 0,05$). Os valores mínimo e máximo obtidos deste grupo variaram entre 0,31 a 2,85 mg/ml (Tabela 4), sendo o valor de referência médio $1,58 \pm 0,61$ mg/ml.

Confrontando os resultados dos grupos G e NG, foi possível verificar que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,005$) entre os valores de haptoglobina a partir da 4ª semana, persistindo até a 9ª semana.

Tabela 4 – Valores médios e desvios padrão das concentrações séricas de haptoglobina durante as semanas de diestro e de gestação – São Paulo – 2006

Semanas	Haptoglobina (mg/ml)	
	Grupos	
	NG	G
1	$1,66 \pm 0,79$	$1,81 \pm 1,64$
2	$1,44 \pm 0,75$	$2,83 \pm 1,56$
3	$1,56 \pm 0,69$	$2,69 \pm 1,24$
4	$1,75 \pm 0,49$	$8,06 \pm 3,72$
5	$1,75 \pm 0,82$	$11,11 \pm 1,7$
6	$1,42 \pm 0,65$	$10,48 \pm 3,18$
7	$1,56 \pm 0,34$	$8,64 \pm 2,87$
8	$1,75 \pm 0,38$	$6,82 \pm 3,10$
9	$1,52 \pm 0,73$	$6,16 \pm 1,99$

Gráfico 7 – Valores médios representando valores médios de haptoglobina (mg/ml) durante as semanas em cadelas gestantes e não gestantes – São Paulo – 2006

Gráfico 8 - Dispersão entre concentrações de haptoglobina (Hp) e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo – 2006

Gráfico 9 – Dispersão entre concentrações de haptoglobina (Hp) e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo – 2006

Gráfico 10 – Box-Plot das concentrações séricas da haptoglobina (Hp) e idade gestacional, com representação da media e desvio padrão – São Paulo – 2006

Gráfico 11 – Dispersão entre valores máximos de haptoglobina e número de filhotes nascidos, com representação de R^2 – São Paulo – 2006

4.3.2 Glicoproteína ácida $\alpha 1$ (GA $\alpha 1$)

No grupo G pode-se notar que há um aumento nas concentrações séricas de GA $\alpha 1$ a partir da 2ª ($199,5 \pm 63,1 \mu\text{g/ml}$) até a 5ª semana, quando atingiu a concentração máxima com $449 \pm 146,91 \mu\text{g/ml}$ (Tabela 5), (Gráfico 12 e Gráfico 15). Pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls pode-se observar que as semanas 1, 2, 3 e 4 são significativamente diferentes da 5ª semana ($p < 0,001$), a 5ª semana difere da 6ª, 7ª semanas ($p < 0,06$) e da 8ª e 9ª semanas ($p < 0,05$). O intervalo das concentrações durante as semanas de gestação foi de 60,0 a 660,0 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 5) e o valor de referência médio das semanas de gestação foi de $282,41 \pm 120,78 \mu\text{g/ml}$.

Foram construídos gráficos de dispersão em 2 períodos diferentes da gestação, com representação da linha de tendência, equação da regressão e R^2 :

- da 1ª semana à 5ª semana, quando da concentração máxima de GA α 1 (Gráfico 13).
- da 5ª semana até o parto (Gráfico 14).

A figura 26 representa a dispersão e a regressão ($R^2 = 0,346$) entre os valores individuais máximos de GA α 1 e o número de filhotes nascidos por cadela e demonstra que somente 34,6% de variabilidade da amostra é explicada pela reta de regressão, ou seja, a concentração máxima de GA α 1 é pouco justificada pelo número de sítios de implantação embrionária.

Entre as semanas do grupo NG, não foram observadas alterações significativas entre as concentrações médias durante as semanas correspondentes ao diestro ($p > 0,05$). Os valores mínimo e máximo obtidos deste grupo variaram entre 100,00 a 350,00 $\mu\text{g/ml}$ e o valor de referência médio $195,49 \pm 56,96 \mu\text{g/ml}$.

Ao comparar os resultados dos grupos G e NG, foi possível verificar que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,005$) entre as os valores de GA α 1 a partir da 5ª semana, persistindo até a 7ª semana.

Tabela 5 – Valores médios e desvios padrão das concentrações séricas de glicoproteína ácida α 1 em cadelas não gestantes e gestantes – São Paulo – 2006

Semanas	Glicoproteína ácida α 1 ($\mu\text{g/ml}$)	
	Grupos	
	NG	G
1	228,82 $\pm$ 76,23	191,09 $\pm$ 50,38
2	164,00 $\pm$ 50,82	199,50 $\pm$ 63,1
3	183,00 $\pm$ 64,30	225,26 $\pm$ 80,79
4	166,00 $\pm$ 45,75	261,00 $\pm$ 92,79
5	166,00 $\pm$ 27,97	449,44 $\pm$ 146,91
6	171,00 $\pm$ 28,07	372,67 $\pm$ 122,27
7	206,00 $\pm$ 60,96	318,82 $\pm$ 103,61
8	203,33 $\pm$ 42,13	295,63 $\pm$ 69,85
9	222,00 $\pm$ 37,95	284,29 $\pm$ 81,87
10	235,00 $\pm$ 19,15	310,00 $\pm$ 70,71

Gráfico 12 – Valores médios glicoproteína ácida $\alpha 1$ (mg/ml) durante as semanas em cadelas gestantes e não gestantes – São Paulo – 2006

Gráfico 13 – Gráfico de dispersão entre concentrações de glicoproteína ácida alfa 1 (GA alfa1) e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo – 2006

Gráfico 14 – Dispersão entre concentrações de glicoproteína ácida alfa 1 (GAalfa1) e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo – 2006

Gráfica 15 – Box-Plot das concentrações séricas de glicoproteína ácida $\alpha 1$ (GA $\alpha 1$) e idade gestacional, com representação da média e desvio padrão – São Paulo – 2006

Gráfico 16 – Dispersão entre valores máximos de glicoproteína ácida $\alpha 1$ e número de filhotes nascidos, com representação de R^2 – São Paulo – 2006

4.3.3 Proteína C reativa (CRP)

Embora o teste ANOVA para medidas repetidas tenha verificado que há diferença entre as semanas de gestação ($p < 0,005$), não se pôde detectar em qual semana houve essa diferença. Entretanto, observando a tabela 6, pode-se notar que os valores médios das concentrações séricas de CRP aumentaram a partir da 1ª ($3,97 \pm 1,91 \mu\text{g/ml}$) atingindo concentração máxima na 5ª semana de gestação com $58,30 \pm 14,69 \mu\text{g/ml}$ e uma diminuição até a 9ª semana (Gráfico 17 e Gráfico 20), mas não o suficiente para atingir os níveis séricos das 2 primeiras semanas de gestação. O intervalo de valores no grupo G foi de 0,08 a $80,00 \mu\text{g/ml}$ e o valor de referência médio das semanas de gestação foi de $24,58 \pm 22,60 \mu\text{g/ml}$.

Foram construídos gráficos de dispersão em 2 períodos diferentes da gestação, com representação da linha de tendência, equação da regressão e R^2 :

- da 1ª semana à 5ª semana, quando da concentração máxima de CRP (Gráfico 18).
- da 5ª semana até o parto (Gráfico 19).

O gráfico 21 representa a dispersão e a regressão ($R^2 = 0,022$) entre os valores individuais máximos de CRP e o número de filhotes nascidos por cadela e demonstra que somente 2,2% de variabilidade da amostra é explicada pela reta de regressão, ou seja, a concentração máxima de CRP é pouco explicada pelo número de sítios de implantação embrionária.

O grupo NG não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as semanas estudadas (Tabela 6 e Gráfico 17). O intervalo entre os valores neste grupo foi de 0,80 a 16,40 $\mu\text{g/ml}$ e o valor de referência médio é de $4,24 \pm 2,81$ $\mu\text{g/ml}$.

Ao comparar os resultados dos grupos G e NG, foi possível verificar que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,005$) entre os valores de GA α 1 a partir da 4ª semana, persistindo até a 7ª semana.

Tabela 6 – Valores médios e desvios padrão das concentrações séricas de proteína C reativa em cadelas não gestantes e gestantes – São Paulo – 2006

semanas	Proteína C reativa ($\mu\text{g/ml}$)	
	Grupos	
	NG	G
1	$3,36 \pm 1,19$	$3,97 \pm 1,91$
2	$3,22 \pm 2,31$	$5,73 \pm 4,94$
3	$4,26 \pm 1,29$	$9,29 \pm 9,22$
4	$2,97 \pm 0,85$	$38,34 \pm 19,52$
5	$4,73 \pm 4,89$	$58,30 \pm 14,69$
6	$4,56 \pm 3,69$	$38,32 \pm 20,55$
7	$5,56 \pm 3,61$	$19,96 \pm 11,84$
8	$4,00 \pm 0,8$	$10,43 \pm 7,37$
9	$4,85 \pm 2,8$	$10,91 \pm 6,99$

Gráfico 17 – Valores médios das concentrações séricas de proteína C reativa (CRP) ($\mu\text{g/ml}$) durante as semanas em cadelas gestantes e não gestantes – São Paulo – 2006

Gráfico 18 – Dispersão entre concentrações de proteína C reativa (CRP) ($\mu\text{g/ml}$) e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo – 2006

Gráfico 19 – Dispersão entre concentrações de proteína C reativa (CRP) ($\mu\text{g/ml}$) e idade gestacional (semanas), com representação da equação de regressão ajustada e R^2 – São Paulo – 2006

Gráfico 20 – Box-Plot das concentrações séricas de proteína C reativa (CRP) ($\mu\text{g/ml}$) e idade gestacional (semanas), com representação da media e desvio padrão – São Paulo – 2006

Gráfico 21 – Dispersão entre valores máximos de CRP e número de filhotes nascidos, com representação de R^2 – São Paulo – 2006

4.4 CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS DBP, DC E EP E A IDADE GESTACIONAL

Por meio do coeficiente de correlação de Pearson, pode-se observar que as variáveis DBP, DC e EP, de todo o período gestacional, estão altamente e diretamente correlacionadas entre si ($p < 0,0001$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Correlação de Pearson entre as variáveis DBP,DC e EP, com representação de CP (coeficiente de correlação de Pearson), P (índice de significância) e N (número de amostras correlacionadas) – São Paulo – 2006

variáveis		DBP	DC	EP
DBP	CP	1,000	0,980	0,957
	P		<0,0001	<0,0001
	N	105	104	104
DC	CP	0,980	1,000	0,942
	P	<0,0001		<0,0001
	N	104	104	104
EP	CP	0,957	0,942	1,000
	P	<0,0001	<0,0001	
	N	104	104	104

Construiu-se um modelo linear multivariado, no qual permaneceram somente as variáveis DBP e DC. Os coeficientes e os respectivos erros padrões estão representados na Tabela 8.

Tabela 8 – Coeficientes e desvios padrões obtidos da análise de regressão multivariada e construção do modelo para estimar a idade gestacional.

	coeficiente	erro padrão	p
constante	22,886	0,356	<0,0001
DBP	1,260	0,084	<0,0001
DC	0,107	0,036	0,004

A equação final está representada abaixo:

$$Y = 22,886 + 1,26 \text{ DBP} + 0,107 \text{ DC}$$

Y = idade gestacional (dias após pico de LH)

DBP = diâmetro biparietal

DC = diâmetro do corpo

O modelo final apresentou-se altamente significativo ($p < 0,0001$) com R^2 ajustado de 0,99.

4.5 CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS $GA\alpha 1$, Hp e CRP E A IDADE GESTACIONAL

O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para as variáveis $GA\alpha 1$, Hp e CRP durante todo o período gestacional. Pode-se observar que estas estão diretamente correlacionadas entre si ($p < 0,0001$) (Tabela 9).

Foi calculado o coeficiente de Pearson para as mesmas variáveis em 2 períodos diferentes da gestação:

- da 1ª semana à 5ª semana, quando da concentração máxima de $GA\alpha 1$, Hp e CRP (Tabela 10).

- da 5ª semana até o parto (Tabela 11).

As variáveis do modelo univariado, quando colocadas no modelo multivariado, perderam a significância.

Tabela 9 – Correlação de Pearson entre as variáveis GA α 1, Hp e CRP, de todo o período gestacional, com representação de CP (coeficiente de correlação de Pearson), P (índice de significância) e N (número de amostras correlacionadas) – São Paulo – 2006

variáveis		GA α 1	Hp	CRP
GA α 1	CP	1,000	0,670	0,495
	P		<0,0001	<0,0001
	N	164	87	113
Hp	CP	0,670	1,000	0,550
	P	<0,0001		<0,0001
	N	87	91	74
CRP	CP	0,495	0,550	1,000
	P	<0,0001	<0,0001	
	N	113	74	121

Tabela 10 – Correlação de Pearson entre as variáveis GA α 1, Hp e CRP, da 1ª à 5ª semana de gestação, com representação de CP (coeficiente de correlação de Pearson), P (índice de significância) e N (número de amostras correlacionadas) – São Paulo – 2006

variáveis		GA α 1	Hp	CRP
GA α 1	CP	1	0,611	0,746
	P		<0,0001	<0,0001
	N	99	99	99
Hp	CP	0,611	1	0,758
	P	<0,0001		<0,0001
	N	99	99	99
CRP	CP	0,556	0,758	1
	P	<0,0001	<0,0001	
	N	99	99	99

Tabela 11 – Correlação de Pearson entre as variáveis GA α 1, Hp e CRP, da 5ª à 10ª semana de gestação, com representação de CP (coeficiente de correlação de Pearson), P (índice de significância) e N (número de amostras correlacionadas) – São Paulo – 2006

variáveis		GA α 1	Hp	CRP
Ga α 1	CP	1	0,183	0,248
	P		>0,05	<0,05
	N	74	74	74
Hp	CP	0,183	1	0,370
	P	>0,05		<0,005
	N	74	74	74
CRP	CP	0,248	0,370	1
	P	<0,05	<0,005	
	N	74	74	74

4.6 CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE GA α 1, Hp e CRP E AS MENSURAÇÕES ULTRA-SONOGRÁFICAS DO DBP, DC E EP

As concentrações das proteínas de fase aguda estudadas foram confrontadas com as mensurações ultra-sonográficas DBP, DC e EP por meio do teste de correlação de Pearson para verificar o grau de correlação entre elas, durante todo o período gestacional, da 1ª à 5ª semana de gestação e da 5ª semana ao parto.

Foi demonstrado que a CRP é correlacionada positivamente com as variáveis GA α 1 e Hp (Tabela 9, Tabela 10 e Tabela. 11) e com as mensurações DBP, DC e EP quando se considera apenas o período compreendido entre a 1ª e a 5ª semana de gestação ($p < 0,0001$) (Tabela 13). Foi correlacionada negativamente com DBP, DC e EP durante a 2ª metade de gestação ($p < 0,0001$) (Tabela 14) e quando foi considerado todo o período ($p < 0,0001$) (Tabela 12).

A GA α 1 é positivamente correlacionada com as demais proteínas de fase aguda e $p < 0,0001$ (Tabela 9) e com as variáveis DBP, DC e EP do início à 5ª semana de gestação ($p < 0,0001$) (Tabela 13). Mas de modo negativo com DBP, DC e EP quando foi considerado o período todo ($p < 0,05$) (Tabela 12) e o período entre a 5ª semana e o parto ($p < 0,0001$) (Tabela 14).

A Hp foi significativamente correlacionada com GA α 1 e CRP durante todo o período gestacional (Tabela 9), mas ao considerar somente a 2ª metade da gestação (5ª semana ao parto), verificou-se que não houve correlação significativa com a proteína GA α 1 ($p>0,05$) (Tabela 11). Com relação às variáveis DBP, DC e EP, não houve correlação significativa com a Hp durante toda a gestação ($p>0,05$) (Tabela 12), em contrapartida, foram correlacionadas com os períodos entre a 1ª e a 5ª semana de gestação ($p<0,0001$) (Tabela 13) e entre a 5ª semana até o parto ($p<0,005$) (Tabela 14).

As variáveis do modelo univariado, quando colocadas no modelo multivariado, perderam a significância.

Tabela 12 – Correlação de Pearson entre as variáveis GA α 1, Hp, CRP, DBP, DC e EP, de todo o período gestacional, com representação de CP (coeficiente de correlação de Pearson), P (índice de significância) e N (número de amostras correlacionadas) – São Paulo – 2006

variáveis		GA α 1	Hp	CRP
DBP	CP	-0,213	-0,136	-0,675
	P	0,046	0,309	<0,0001
	N	88	58	78
DC	CP	-0,251	-0,188	-0,696
	P	0,018	0,158	<0,0001
	N	88	58	78
EP	CP	-0,227	-0,078	-0,689
	P	0,033	0,558	<0,0001
	N	89	59	79

Tabela 13 – Correlação de Pearson entre as variáveis GA α 1, Hp, CRP, DBP, DC e EP, da 1ª à 5ª semana de gestação, com representação de CP (coeficiente de correlação de Pearson), P (índice de significância) e N (número de amostras correlacionadas) – São Paulo – 2006

variáveis		GA α 1	Hp	CRP
DBP	CP	0,658	0,763	0,796
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	N	99	99	99
DC	CP	0,649	0,764	0,795
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	N	99	99	99
EP	CP	0,659	0,814	0,806
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	N	99	99	99

Tabela 14 – Correlação de Pearson entre as variáveis GA α 1, Hp, CRP, DBP, DC e EP, da 5ª semana de gestação até o parto, com representação de CP (coeficiente de correlação de Pearson), P (índice de significância) e N (número de amostras correlacionadas) – São Paulo – 2006

variáveis		GA α 1	Hp	CRP
DBP	CP	-0.127	-0.405	-0.519
	P	0,280	<0,0005	<0,0001
	N	74	74	74
DC	CP	-0.166	-0.439	-0.528
	P	0,157	<0,0001	<0,0001
	N	74	74	74
EP	CP	-0.151	-0.365	-0.540
	P	0,201	<0,001	<0,0001
	N	74	74	74

4.7 DINÂMICA DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA (Hp, CRP e GA α 1) E MENSURAÇÕES ULTRASONOGRÁFICAS NO CONCEPTO (DBP, DC e EP) DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL

Com a finalidade de ilustrar a dinâmica entre as proteínas de fase aguda abordadas neste estudo (Hp, CRP e GA α 1) e as mensurações dos parâmetros gestacionais selecionados (DBP, DC e EP), construiu-se uma tabela (Tabela 15) com valores médios semanais e seus respectivos desvios padrão representados nas tabelas 1 a 6. Com base na tabela 15, foi feito um gráfico (Gráfico 22) que evidencia o perfil das variáveis consideradas neste estudo.

Considerando-se a divisão da gestação em 9 semanas, foi verificado por meio do teste ANOVA de medidas repetidas que há diferença entre as semanas para as variáveis DBP, DC e EP ($p < 0,001$), porém não foi possível identificar entre quais semanas ocorreram as diferenças por insuficiência do tamanho da amostra (teste de Newman-Keuls). O mesmo ocorreu para a variável CRP, no grupo G ($p < 0,001$).

Há diferenças entre as semanas ($p < 0,001$) para a variável Hp, do grupo G. Pôde-se observar que a 5ª e a 6ª semanas diferem significativamente das semanas 1, 2 e 3 ($p < 0,05$). Também foi verificado que as semanas de gestação diferem estatisticamente, para a variável GA α 1 ($p < 0,001$). Pôde-se observar que as semanas 1, 2, 3 e 4 são significativamente diferentes da 5ª semana ($p < 0,001$), a 5ª semana difere da 6ª, 7ª semanas ($p < 0,06$) e da 8ª e 9ª semanas ($p < 0,05$).

Tabela 15 – Valores médios e desvios padrão das mensurações ultra-sonográficas (DBP, DC e EP) e das proteínas de fase aguda (Hp, CRP e GA α 1) em cadelas gestantes – São Paulo – 2006

semanas variáveis	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DBP (mm)				2,23 $\pm$ 1,09	6,35 $\pm$ 1,68	11,17 $\pm$ 1,52	16,19 $\pm$ 1,66	20,19 $\pm$ 1,6	24,89 $\pm$ 1,63
DC (mm)				2,27 $\pm$ 1,09	6,94 $\pm$ 1,84	15,17 $\pm$ 3,88	27,8 $\pm$ 4,01	40,33 $\pm$ 5,15	53,27 $\pm$ 5,52
EP (mm)				1,56 $\pm$ 0,5	2,5 $\pm$ 0,49	3,89 $\pm$ 0,9	6,31 $\pm$ 1,04	7,36 $\pm$ 0,77	8,22 $\pm$ 1,12
GAα1 (μg/ml)	191,09 $\pm$ 50,38	199,50 $\pm$ 63,1	225,26 $\pm$ 80,79	261,00 $\pm$ 92,79	449,44 $\pm$ 146,91	372,67 $\pm$ 122,27	318,82 $\pm$ 103,61	295,63 $\pm$ 69,85	284,29 $\pm$ 81,87
CRP (μg/ml)	3,97 $\pm$ 1,91	5,73 $\pm$ 4,94	9,29 $\pm$ 9,22	38,34 $\pm$ 19,52	58,30 $\pm$ 14,69	38,32 $\pm$ 20,55	19,96 $\pm$ 11,84	10,43 $\pm$ 7,37	10,91 $\pm$ 6,99
Hp (mg/ml)	1,81 $\pm$ 1,64	2,83 $\pm$ 1,56	2,69 $\pm$ 1,24	8,06 $\pm$ 3,72	11,11 $\pm$ 1,7	10,48 $\pm$ 3,18	8,64 $\pm$ 2,87	6,82 $\pm$ 3,10	6,16 $\pm$ 1,99

Gráfico 22 – Gráfico de linhas dos valores médios das mensurações ultra-sonográficas (DBP, DC e EP – em mm) e das proteínas Hp (mg/ml) (10^2), CRP (μ g/ml) (10^1) e GA α 1 (μ g/ml), em função da idade gestacional (semanas) – São Paulo – 2006

5. Discussão

5 DISCUSSÃO

A ultra-sonografia é uma boa técnica de diagnóstico pois permite a observação de órgãos e estruturas internas, de um modo não invasivo, indolor, requer pouca preparação do paciente, além do aparelho poder ser portátil e o exame ter um custo relativamente baixo. O ultra-som também evidencia tamanho, forma, posição, relação espacial com outros órgãos e diferenciação de tipos teciduais, inclusive dentro do mesmo órgão (NYLAND, 2002). Por esses motivos a ultra-sonografia tem sido cada vez mais utilizada, tanto para estudos sobre anatomia ultra-sonográfica, quanto como método de diagnóstico e também para acompanhamento pré-natal, tanto no homem como já se faz rotineiramente há mais de 20 anos, quanto nos animais.

Neste estudo foi utilizado apenas ultra-som de modo B, pois se mostrou ser o mais adequado permitindo que o exame seja dinâmico, e assim, mais preciso que os demais modos para esta finalidade. É amplamente aceito que a exposição do embrião e feto às ondas B de ultra-som seja segura, mas estudos ainda precisam ser realizados para melhor avaliação dos possíveis efeitos adversos da utilização desta tecnologia em gestações. Marinac-Dabic et al. (2002) observaram que pode haver correlação entre a exposição ao ultra-som e a incidência de restrição de crescimento, retardo no início da fala, dislexia e de não destros em crianças. Por outro lado, Nyland et al. (2002) insistem que não há confirmação de efeitos biológicos tanto nos pacientes como nos operadores de aparelhos de ultra-som e que os conhecimentos atuais indicam que os benefícios obtidos por este método claramente se sobrepõem a quaisquer riscos potenciais. Em medicina veterinária não há referências que evidenciem os efeitos do ultra-som no transcorrer da gestação ou em relação ao aparecimento de alterações no desenvolvimento dos animais nascidos.

A ultra-sonografia tem sido um instrumento muito útil para o estudo e monitoramento da gestação em cães (ALMEIDA, 2002; BECCAGLIA; LUVONI, 2004; CONCANNON, 2000; CONCANNON; 2001; ENGLAND et al., (1990); KUTZLER, 2003; LUVONI; GRIONI, 2000; SHILLE; GONTAREK, 1985; SON, 2001; YEAGER et al., 1992) e em outras espécies, entre elas: eqüinos, suínos,

bovinos, caprinos, ovinos e felinos (CHAVATTE-PALMER et al., 2006; CHAVEZ, 1996; DAVIDSON et al., 1986; KAHN, 1989; KAHN, 1990; KAUFFOLD et al., 1997; MARTINEZ, 1998; PIERSON, 1984; PIPERS, 1984; SAUNDERS, 1992; SERGEEV, 1990).

Vários autores realizaram estudos comparados sobre as diversas técnicas para detecção e acompanhamento da gestação em cadelas (ALLEN; MEREDITH, 1981; ALMEIDA, 2002; SAUNDERS, 1992; SHILLE, 1985), tais técnicas correspondem à palpação abdominal, radiografia e ultra-sonografia e concluíram que o último é o melhor método pois apresenta diversas vantagens sobre os demais, tais como, maior precisão, sensibilidade e ainda determinação da viabilidade fetal por meio da detecção dos batimentos cardíacos, movimentação e desenvolvimento normal do corpo fetal. Mas a ultra-sonografia limita-se por ser um indicador impreciso para a contagem de filhotes, como também foi observado neste estudo e está de acordo com Allen e Meredith (1981); Bondestam (1983); Davidson et al. (1986), Saunders (1992) e Yeager et al. (1992).

Os transdutores empregados neste estudo foram: um setorial de 5 MHz e um linear de 7,5 MHz, pois no início da gestação quando as estruturas a serem observadas são de pequenas dimensões e mais superficiais, um transdutor de maior frequência proporciona uma penetração menor e uma melhor resolução da imagem obtida e ao contrário, conforme a gestação evolui, as estruturas relacionadas a ela vão ficando maiores e mais profundamente localizadas no abdome e portanto o transdutor de 5 MHz mostra-se mais adequado para a abordagem de algumas estruturas presentes nas duas últimas semanas de gestação. Esta metodologia está de acordo com diversos autores (LORIOT, 1997; NYLAND, 2002; SAUNDERS, 1992; YEAGER; CONCANNON, 1992).

A duração da gestação nos cães varia de acordo com o método utilizado para determinar o seu início, o dia “0” pode ser considerado o dia do acasalamento (CARTEE e ROWLES, 1984), o dia de concentração sérica máxima de LH ou o dia estimado da ovulação (ENGLAND; CONCANNON, 2002; HASE et al., 2000; ROOT-KUSTRITZ, 2005). Porém o período de fértil da cadela pode variar consideravelmente e a data do acasalamento não consiste em um bom indicativo de idade gestacional. A ovulação nos cães ocorre com a liberação de ovócitos primários entre 36 e 48 horas após a concentração sérica máxima de LH e a subsequente

maturação nas tubas uterinas, em mais 48 a 60 horas. Este longo período entre a concentração sérica máxima de LH e o desenvolvimento dos ovócitos secundários, somado ao número de dias em que o espermatozóide permanece viável no aparelho genital feminino, de 7 a 10 dias e ainda à possibilidade da fecundação ocorrer durante a maturação do ovócito contribuem para variação da duração da gestação nesta espécie (BYSTED et al., 2001). Concannon (1983) conclui que o dia do início da gestação deve ser aquele em que ocorre a concentração sérica máxima de LH pois proporciona uma variação menor da duração da gestação, que é de 65 ± 1 dia.

Neste estudo, o dia "0" da gestação foi considerado aquele em que a concentração sérica de progesterona foi igual ou maior que 2 ng/ml e a duração da gestação foi de 65 ± 1 dia, de acordo com o que foi descrito por: Concannon et al. (1983), Bysted et al. (2001), England et al. (2002), Goodman (2001), Kutzler et al. (2003).

Entre as cadelas examinadas neste estudo, 2 delas eram primíparas e 7 múltiparas. O número médio de filhotes por ninhada nas primíparas ($7,0 \pm 2,8$), foi aparentemente maior que nas múltiparas ($6,0 \pm 2,16$), mas a análise estatística mostrou que a diferença entre as médias não foi significativa, assim como ocorreu com a duração média da gestação nos 2 grupos. Tal como também afirmam Okkens et al. (1993) e Eilts et al. (2005), em estudos para determinar os efeitos da idade, raça, paridade e tamanho da ninhada na duração da gestação em cadelas ao concluírem que não há diferença na duração da gestação entre cadelas primíparas e múltiparas, assim como o tamanho da ninhada pode influenciar na duração da gestação. Mas Okkens et al. (2001) concluíram, após terem estudado 113 cadelas de 6 raças diferentes, que a duração da gestação é, na verdade, influenciada pela raça da cadela mais do que puramente pelo tamanho da ninhada.

As observações ultra-sonográficas do surgimento e desenvolvimento das estruturas gestacionais foram consistentes entre as cadelas Boxers estudadas quando a idade gestacional foi baseada no dia do pico pré-ovulatório de LH. A variação da idade gestacional no momento da detecção inicial da maioria das estruturas estudadas foi menor ou igual a 6 dias.

A variabilidade das mensurações médias das estruturas foi pequena e é ilustrada nas tabelas 1, 2 e 3, observando os desvios padrões. Houve uma alta correlação entre o tamanho das estruturas gestacionais e a idade gestacional, o que pode ser verificado nos gráficos 14, 15 e 16 e seus R^2 . Por esses motivos, tanto a

cronologia do surgimento e desenvolvimento, quanto o tamanho das estruturas gestacionais, compõem instrumentos úteis para a estimativa da idade gestacional.

Neste estudo, as primeiras observações do conceito foram feitas do 18º ao 23º dia de gestação, representado por imagem anaecóica, circular, com as margens dorsal e ventral hiperecóicas, medindo 2 a 3 mm de diâmetro (DTC) e localizado no interior do corpo uterino. Como também foi observado por Yeager et al. (1992) e por England (1998).

Em um estudo prévio, realizado por Almeida (2002), em cadelas da raça Boxer, se mensurou diversas variáveis gestacionais por meio de ultra-som, tais como: diâmetro transversal do conceito (DTC), espessura da placenta (EP), largura da placenta (LP), diâmetro biparietal (DBP), comprimento da cabeça (CC), altura da cabeça (HC), diâmetro do corpo (DC), perímetro do corpo (PC), área do corpo (AC), comprimento do corpo (CCR) e comprimento do fêmur (CF). Dentre elas, aquelas que apresentaram melhor correlação com a data do parto foram: EP, DBP e DC. Portanto estas mesmas variáveis foram selecionadas para serem aferidas neste ensaio e correlacionadas com a idade gestacional e com a concentração sérica de proteínas de fase aguda.

De acordo com Yeager (1992), a placenta é representada pela camada mais interna, ecogênica, da parede uterina, nos locais de implantação dos blastocistos. Este aumento da ecogenicidade é coerente com o que refere Romanucci (1950), em seu trabalho sobre a placentação no cão, que o início da formação dos vilos coriônicos ocorre no 20º dia após o pico de LH e segundo as observações feitas por Concannon (2000), o trofotoderma inicia sua invasão no endométrio no 22º dia e estão completamente estabelecidos no 27º dia de gestação, coincidindo com a detecção da placenta zonária. Sendo assim, a placenta foi primeiro identificada, neste estudo, no 22º dia ou 3ª semana de gestação com $1,0 \pm 0,0$ mm de espessura (EP), tal como refere Luvoni e Grioni (2000) e Son et al. (2001) e apresentou-se tipicamente zonária anular do 27º ao 29º dia de gestação, marcando a transição da 4ª para a 5ª semana de gestação. O que se aproxima dos resultados obtidos por SON et al. (2001) em seu trabalho com Yorkshire terriers e malteses, por Peter e Jakovljevic (1992) e por Yeager et al. (1992) que mensurou a placenta de Beagles.

A partir do início da 4ª semana (22º ao 24º dia) de gestação foi possível aferir o DC com um valor médio de $2,27 \pm 1,09$ mm. A curva de crescimento do DC, assim

como do DBP e da EP, apresentou-se linear e altamente correlacionada à idade gestacional. Este resultado está de acordo com England et al. (1990).

Além das variáveis descritas acima (EP, DC e DBP), as quais foram mensuradas e matematicamente correlacionadas à idade gestacional, foi observada a cronologia do surgimento e desenvolvimento de outras estruturas embrionárias ou fetais, tais como: batimentos cardíacos, cabeça e tronco individualizados, brotos dos membros torácicos e pélvicos, estômago, bexiga, rins (pelve renal), mineralização do esqueleto, individualização da alças intestinais e desenvolvimento das membranas fetais.

O período gestacional foi dividido em 9 semanas, de maneira que tanto as mensurações ultra-sonográficas, quanto as concentrações séricas de proteínas de fase aguda e a cronologia de aparência e surgimento de estruturas gestacionais pudessem ser comparadas entre si, por semana de gestação.

O blastocisto implanta-se no endométrio por volta 21º dia de gestação, quando é possível observá-lo por meio de exames ultra-sonográficos. Antes deste evento não há alterações detectáveis por métodos diagnósticos disponíveis que possam levar a um diagnóstico seguro de gestação. Sendo assim, as duas primeiras semanas de gestação não apresentaram características diferenciadas entre os grupos G e NG.

A primeira evidência de gestação foi apenas detectada no final da terceira ao início da 4ª semana (18º ao 23º dia) de gestação, por imagens ultra-sonográficas de vesículas anaecóicas, com aproximadamente 2 mm de diâmetro, considerados como sendo os conceitos, também chamados blastocistos ou vesículas gestacionais. Estas observações estão de acordo com o que foi descrito por Evans (1993), em seu trabalho sobre o desenvolvimento pré-natal nos cães, onde descreve que o blastocisto, quando da implantação, apresenta uma “faixa primitiva”, representando a massa celular embrionária, não detectável por ultra-som e uma cavidade chamada de blastocelo, a qual em uma fase adiante (início da 4ª semana) será ocupada pelo saco vitelino (SV).

A identificação da placenta ocorreu no início da 4ª semana (22º dia) e sua caracterização zonária, no final deste período. Os batimentos cardíacos foram detectados entre o final da 3ª e o início da 4ª semana (20º ao 24º dia) de gestação, um pouco antes da observação do embrião com contornos definidos (22º ao 24º dia), a partir de quando foi possível mensurar o DC. No final da 4ª semana, pôde-se

individualizar a cabeça e o tronco do embrião e aferiu-se o DBP, tal como refere Yeager (1992).

Apesar de ser formado no embrião de 27 dias (32 somitos) (EVANS, 1993), o âmnio foi apenas detectado por exames ultra-sonográficos, na 5ª semana de gestação (30º ao 33º dia), como uma membrana hiperecótica que envolve o embrião e continua visível até o ultimo exame antes do parto.

Foi também no início deste período (31º ao 33º dia) que o SV apareceu, em secção sagital, como duas membranas paralelas que percorrem o concepto, de um extremo ao outro, posicionado ventralmente ao embrião. Isto se deve ao intenso desenvolvimento do alantóide que acaba por contactar amplamente o córion, transformando a placenta coriovitelínica em corioalantoidea (NODEN e LAHUNTA, 1990). Embora este processo se inicie a partir do 24º dia de gestação (MIGLINO et al., 2006), só é detectável na 5ª semana.

EVANS, em 1993, refere que o embrião de 27 dias (32 somitos), apresenta os membros torácicos proeminentes, mas apenas foram detectáveis por ultra-som a partir do dia 30º dia (5ª semana) de gestação, coincidindo com a fase laminar dos brotos dos membros, característica do embrião de 29 dias. As características de posição, maturidade e ecogenicidade das estruturas fetais podem atrasar sua detecção por ultra-sonografia (YEAGER e CONCANNON, 1992).

A região da cabeça fetal começou a dar sinais ultra-sonográficos de ossificação a partir do final da 5ª semana (32º ao 37º dia) de gestação. Concannon (1992) também relatou que a ossificação fetal foi detectada no mesmo período. O que coincide com a descrição de desenvolvimento pré-natal feita por Evans (1993), afirmando que a ossificação da cabeça fetal ocorre no embrião de 37 dias.

A 6ª semana de gestação é marcada pela detecção do estômago (34º ao 39º dia) e bexiga fetal (36º ao 38º dia), e pelo primeiro exame ultra-sonográfico em que o CCR ultrapassa os limites (largura) da placenta (LP), sinalizando o término da 6ª semana (39º ao 42º dia) de gestação. A cronologia do surgimento e suas características ultra-sonográficas das estruturas citadas estão de acordo com Concannon (1992), que estudou a gestação em Beagles.

A partir do início da 7ª semana de gestação, não foi mais possível evidenciar o saco vitelino por meio da ultra-sonografia, pois a partir do final da 4ª semana segue progressivamente diminuindo sua repleção. Embora o SV esteja presente até o final da gestação como uma grande estrutura de paredes enrugadas e altamente

vascularizada (LEE e MOSSMAN et al.; 1983), o seu posicionamento ventral ao feto e muito próximo ao cordão umbilical desfavorece a observação por exames ultra-sonográficos a partir do 44º ao 48º dia de gestação.

A partir da 8ª semana, parece haver poucas modificações ou surgimento de estruturas anatômicas fetais detectáveis pela ultra-sonografia, por isso a avaliação isolada este parâmetro não é eficiente para a estimativa da idade gestacional. Entre as poucas novas características deste período, está a individualização das alças intestinais do feto na 8ª semana de gestação e os movimentos peristálticos notados apenas a partir do final da 9ª semana, denotando amadurecimento deste órgão.

Não foi possível, nesta oportunidade, estudar a influência do tamanho da ninhada sobre o desenvolvimento das estruturas relacionadas à gestação, devido ao pequeno número de cadelas estudadas para este fim, e conseqüentemente também pequeno número de gestações com mais de 6 e menos de 4 filhotes.

As variáveis: DBP, DC e EP., apresentaram-se tecnicamente fáceis de serem mensuradas. Os valores obtidos foram consistentes entre os conceitos aferidos, positivamente correlacionados com a idade gestacional e as médias semanais, significativamente diferentes entre si ($p < 0,001$), apesar de o teste ANOVA para medidas repetidas não ter detectado em quais semanas estavam as diferenças (devido ao tamanho insuficiente das amostras).

Entre as 3 variáveis mensuradas por ultra-sonografia, contatou-se neste estudo que o DBP apresentou maior R^2 (0,99), com relação à idade gestacional, quando comparado ao DC e à EP, com 0,96 e 0,90, respectivamente. Este resultado está de acordo com o que também foi observado por Yeager e Concannon (1992) em Beagles, por Luvoni e Grioni (2000) em cadelas de pequeno porte, por Son (2001) em Malteses e Yorkshire terriers. England et al. (1990) em estudo no qual utilizaram Retrievers do Labrador e Golden Retrievers e Luvoni e Grioni (2000), raças de médio porte, encontraram índices de correlação menores para o DBP, mas ainda o melhor correlacionado com a idade gestacional quando comparado à outras variáveis gestacionais.

Baseado unicamente nas mensurações dos parâmetros acima mencionados, sugere-se uma fórmula obtida de modelo estatístico, o qual rejeitou a variável EP por diminuir o índice de correlação da estimativa da idade gestacional quando combinada com as variáveis DBP e DC.

Esta fórmula estima a idade gestacional em cadelas da raça Boxer que

acasalaram com padreadores da mesma raça, com $R^2 = 0,99$, utilizando a média das mensurações de, no mínimo, 2 variáveis, aferidas naquele exame. O resultado é obtido em número de dias após a concentração sérica máxima de LH, considerado como a idade gestacional. Concannon et al., em 1992, realizaram um estudo semelhante a este em cães da raça Beagle e também sugerem fórmulas para estimar a idade gestacional, assim como fizeram England et al. (1990), em cães labrador retrievers, golden retrievers e cães mestiçados, Son et al. (2002), utilizando Yorkshire terriers e Malteses.

A estimativa da idade gestacional por meio de fórmulas só é válida em gestações normais, ou seja, na eventualidade de alterações que provoquem diminuição ou aumento do tamanho normal das estruturas a serem mensuradas em determinado período da gestação, resultará em erro de estimativa do dia do parto. Por esse motivo, deve-se aliar a este método a observação do surgimento e aparência ultra-sonográfica dos órgãos e estruturas fetais, pois comprovadamente apresentam cronologia, aparência e ecogenicidade muito semelhantes entre os cães, independentemente do tamanho e da raça, como foi observado por Saunders (1992) e Evans (1993).

As proteínas de fase aguda abordadas neste estudo foram a glicoproteína ácida α_1 (GA α_1), proteína C reativa (CRP) e haptoglobina (Hp), pois são considerados marcadores biológicos importantes, produzidas em resposta à injúria tecidual, como referiram Thompson et al. (1992); Gruys et al. (1993) e Gruys et al. (1994).

A implantação dos blastocistos no endométrio configura uma reação inflamatória generalizada, causando uma resposta de fase aguda (ECKERSALL et al., 1993; CERON et al., 2005). Mediadores da resposta inflamatória aguda atuam nos hepatócitos, estimulando a síntese de proteínas de fase aguda (GRUYS et al., 1994).

Neste trabalho, as concentrações séricas das proteínas GA α_1 , CRP e Hp foram determinadas em cadelas gestantes e não gestantes, com a finalidade determinar seu perfil, compará-las às mensurações ultra-sonográficas de variáveis gestacionais selecionadas (DBP, DC e EP) e estabelecer uma dinâmica entre essas proteínas de fase aguda e as mensurações ultra-sonográficas durante a gestação normal em cadelas da raça Boxer.

A implantação dos embriões ocorre entre o 21º e o 22º dia de gestação (início

da 4ª semana) (CONCANNON, TSUTSUI e SHILLE, 2001), período aproximado em que as concentrações séricas das proteínas de fase aguda começaram a aumentar ou apresentaram-se significativamente maiores quando comparadas ao grupo NG.

A haptoglobina sérica, no grupo G, apresentou concentração significativamente maior ao ser comparada ao grupo NG, a partir da 4ª semana até o parto e a concentração sérica máxima foi atingida na 5ª semana de gestação ($11,11 \pm 1,7$ mg/ml). Considerando-se que o fator desencadeador da reação de fase aguda seja a implantação do blastocisto no início da 4ª semana de gestação, pode-se afirmar que o período em que foram detectados níveis séricos máximos desta proteína, aproxima-se dos resultados de Conner et al. (1988), onde detectaram início de aumento de concentração de Hp em menos de 24 horas após trauma cirúrgico, alcançando níveis máximos no 3º ao 5º dia pós-operatório.

Após a 5ª semana de gestação, as concentrações médias de Hp, no grupo G, diminuíram paulatinamente até o parto ($6,16 \pm 1,99$ mg/ml), permanecendo ainda significativamente maior quando comparadas ao grupo NG ($1,52 \pm 0,73$ mg/ml), este evento poderia ser justificado pelas funções biológicas desta proteína, entre elas: efeito bacteriostático, estimulação de angiogênese, participação no metabolismo de lipídios e efeito imunomodulatório (PETERSEN et al., 2004). Tais efeitos seriam muito convenientes durante o parto, no puerpério e também durante a amamentação dos filhotes, porém este estudo não abordou períodos posteriores ao parto. Deste modo, não é possível afirmar que os níveis de Hp permaneceram altos após o nascimento dos filhotes.

Diversos autores estabeleceram valores para concentrações de Hp em cães com processos inflamatórios e em cadelas gestantes. Conner et al. (1988) estudou cães com processo inflamatório agudo e obteve média de 320,01 mg/dl e Vannucchi et al. (2000) obtiveram um valor de referência médio de $129,56 \pm 17,76$ mg/dl, para cadelas gestantes e $80,22 \pm 4,90$ mg/d para cadelas não gestantes. Esses valores foram expressos em mg/dl de capacidade ligante de HbCN (cianometahemoglobina).

O valor de referência para haptoglobina obtido neste trabalho para cadelas gestantes foi de $6,94 \pm 4,07$ mg/ml e para cadelas não gestante, $1,58 \pm 0,61$ mg/ml. O fato dos valores de referência de ambos os grupos (G e NG) serem inferiores aos obtidos por Conner et al. (1988) e por Vannucchi (2002), pode ser explicado pela diferença na metodologia aplicada para a dosagem de Hp.

Assim como neste estudo, Martinez-Subiela e Cerón (2002) utilizaram kits

comerciais (Phase Haptoglobin Assay[®] - Tridelta Development Limited) para a dosagem de Hp, e referem concentrações séricas, em animais saudáveis e não gestantes, entre $0,2 \pm 0,14$ g/l e $1,56 \pm 0,56$ g/l. Estes resultados coincidem com os obtidos neste estudo para a Hp no grupo NG.

Outros autores utilizaram kits comerciais de outros fabricantes, mas com a mesma metodologia para a dosagem desta proteína. Foi verificado por Martinez-Subiela et al. (2002) que cães saudáveis apresentaram concentração média de Hp de $1,95 \pm 0,4$ g/l, enquanto os valores obtidos para cães com Leishmaniose e sintomáticos foram $8,8 \pm 5,89$ g/l e para os assintomáticos $8,2 \pm 4,94$ g/l. McGrotty e Eckersall (2003) dosaram haptoglobina em cães saudáveis (0,09 a 1,6 g/l) e em outros com diversas afecções clínicas, entre elas, neoplasia (0,85 a 31,8 g/l). Mas nenhum desses autores abordou a gestação em cadelas, dosando Hp sérica, por meio de metodologia compatível àquela utilizada neste estudo. Sendo assim, os resultados deste trabalho para as concentrações de haptoglobina, são inéditos, em cadelas gestantes, utilizando a presente metodologia.

Avaliando os resultados de haptoglobina, nota-se que houve diferença significativa, entre os grupos G e NG, a partir de 4ª semana de gestação. Portanto, pode-se afirmar que valores superiores a $8,06 \pm 3,72$ mg/ml, são sugestivos de gestação em cadelas livres de infecção, trauma ou outros processos inflamatórios.

A GA α 1 apresentou diferença significativa entre os grupos G e NG apenas da 5ª à 7ª semana de gestação, sendo que a 5ª semana ($449,44 \pm 146,91$ μ g/ml) difere estatisticamente da 6ª ($372,67 \pm 122,27$ μ g/ml), da 7ª ($318,82 \pm 103,61$ μ g/ml), da 8ª ($295,63 \pm 69,85$ μ g/ml) e da 9ª ($284,29 \pm 69,85$ μ g/ml) semanas, no grupo G, apresentando valores máximos na 5ª semana. O valor de referência médio dos grupos G e NG foram $282 \pm 120,78$ μ g/ml e $195 \pm 56,96$, respectivamente. Os intervalos das concentrações durante as semanas de gestação e o valor de referência médio, foram menores quando comparados aos resultados apresentados por Kuribayashi et al. (2003) ao estudar Beagles, os quais foram 250 a 1000 μ g/ml (634 ± 246 μ g/ml) em cadelas gestantes e 47 a 833 μ g/ml (316 ± 199 μ g/ml) em cães saudáveis e não gestantes.

Porém os tempos em que ocorreram os aumentos, as concentrações máximas e as diminuições de valores séricos foram muito semelhantes entre os 2 estudos.

Os valores de referência médios do grupo G são significativamente maiores que no grupo NG, indicando que houve aumento de GA α 1 nas cadelas gestantes, como também foi observado por Kuribayashi et al. (2003).

Neste estudo foram empregados kits comerciais (Canine α 1 Acid Glycoprotein measurement kit[®] - Tridelta Development Limited) para a dosagem da GA α 1, em soro de cães da raça Boxer, por meio de reação de precipitação radial simples, enquanto Kuribayashi et al. (2003) utilizaram imunoensaio turbidimétrico para quantificar a mesma proteína em soro de Beagles. As diferenças de metodologias aplicadas ou das raças estudadas poderiam justificar a discrepância de valores obtidos entre os 2 trabalhos.

As concentrações séricas de CRP, no grupo G, apresentaram valores significativamente maiores ao serem comparados ao grupo NG, a partir da 4^a à 7^a semana de gestação. Embora o teste ANOVA para medidas repetidas tenha verificado que há diferença entre as semanas de gestação ($p < 0,005$), não se pôde detectar em qual semana houve essa diferença, mas observou-se que concentrações máximas foram atingidas na 5^a semana de gestação ($58,30 \pm 14,69$ μ g/ml). A partir da 3^a semana, foi possível observar um aumento abrupto nas concentrações de CRP, que pode ser explicado fazendo-se uma analogia ao pronto aumento de sua concentração sérica, em casos de infecção, antes mesmo do aumento de temperatura retal (PETERSEN, et al., 2004). Neste caso, o estímulo seria de origem inflamatória, provocado pela implantação do embrião no endométrio, no início da 3^a semana de gestação (21^o ao 22^o dia).

O valor de referência médio para CRP obtido neste trabalho para cadelas gestantes foi de $24,58 \pm 22,60$ μ g/ml, e para as cadelas não gestantes, os valores médios foram $1,58 \pm 0,61$ mg/ml, sem diferença significativa entre as semanas estuda neste grupo. Estes resultados foram menores aos encontrados por KURIBAYASHI et al. (2003) em ambos os grupos. No entanto, os períodos em que ocorreram os aumentos, valores máximos e diminuições nas concentrações de CRP, no grupo G, foram os mesmos em ambos os estudos. Este mesmo evento também ocorreu ao comparar as concentrações de GA α 1 entre os mesmos trabalhos, o que pode reforçar a hipótese de que o agente causador das diferenças de valores encontrados ser a divergência entre as metodologias aplicadas ou entre as raças caninas abordadas.

Autores que utilizaram ELISA com anticorpo de captura (Phase Canine C –

Reactive Protein Assay[®] - Tridelta Development Limited) (MARTÍNEZ-SUBIELA; CERÓN, 2002; MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2002; MATIJATKO et al., 2006) encontraram resultados semelhantes para concentrações médias de CRP em cães saudáveis e não gestantes, entre si e este trabalho.

Nenhum destes autores dosou a CRP em cadelas gestantes e sim em cães com leishmaniose (MARTÍNEZ-SUBIELA e CERÓN, 2002) e babesiose (MATIJATKO et al., 2006). As concentrações séricas médias observadas em casos de leishmaniose sintomática foram $65,03 \pm 55,06$ g/l e $30,8 \pm 37,9$ g/l nos assintomáticos e atingiu concentrações máximas de 175 ± 75 µg/ml 24 horas após a infecção por *Babesia canis*.

Avaliando os resultados de CRP, nota-se que houve diferença significativa, entre os grupos G e NG, a partir de 4ª semana de gestação. Portanto, pode-se afirmar que valores superiores a $38,34 \pm 19,52$ µg/ml, são sugestivos de gestação em cadelas livres de infecção, trauma ou outros processos inflamatórios.

Ao revisar a literatura, não foram encontrados outros estudos que dosaram Hp, GA α 1 e CRP em cadelas gestantes utilizando Phase Haptoglobin Assay[®], Canine α 1 Acid Glycoprotein measurement kit[®] e Phase Canine C – Reactive Protein Assay[®], Tridelta Development Limited, de modo que os resultados obtidos nesta oportunidade podem servir como referência para futuros trabalhos nesta área.

A resposta de fase aguda é uma reação inflamatória inespecífica que ocorre pouco depois de uma injúria tecidual qualquer (CERÓN et. al., 2005) e a invasão embriológica endometrial consiste em um estímulo para uma reação inflamatória. Com o propósito de verificar se o número de conceitos implantados está relacionado à intensidade das concentrações séricas máximas atingidas pela Hp, GA α 1 e CRP, foram realizadas as dispersões com as concentrações máximas de cada proteína, por cadela, e os respectivos números de filhotes nascidos. Porém foi constatado que as concentrações máximas de Hp GA α 1 e CRP não são explicadas pelo número de embriões implantados, $R^2 = 0,087$; $0,34$ e $0,022$; respectivamente. Este resultado pode ser explicado se o estímulo para a produção de proteínas de fase aguda for de ordem qualitativa e não quantitativa.

Para estabelecer uma dinâmica entre as variáveis abordadas neste estudo (DBP, DC, EP, Hp, GA α 1 e CRP), foram realizadas: dispersões e testes de correlação entre elas e a idade gestacional e finalmente uma tabela e seu respectivo gráfico com valores médios em função da idade gestacional em semanas (Tabela 15

e Gráfico 22).

As dispersões entre as proteínas de fase aguda e suas respectivas idades gestacionais foram realizadas em 2 tempos: da 1ª à 5ª semana de gestação (Fig. 18, 23 e 28) e da 5ª à 9ª semana de gestação (Fig. 19, 24 e 29). Os R^2 encontrados no 1º tempo para Hp, GA α 1 e CRP foram 0,60; 0,39 e 0,62 e no 2º tempo, 0,30, 0,21 e 0,61; respectivamente e não são explicados satisfatoriamente pela idade gestacional. Foi demonstrado também que até a 5ª semana de gestação, essas variáveis foram correlacionadas positivamente com a idade gestacional (Fig. 18, 23 e 28), mas no 2º tempo a correlação mostrou-se negativa (Fig. 19, 24 e 29), ou seja, enquanto a idade gestacional aumenta, as concentrações de proteínas de fase aguda diminuem.

O teste de correlação de Pearson também indicou coeficientes negativos, a partir da 5ª semana de gestação até o parto (Tab. 14), ao confrontar as mensurações ultra-sonográficas às concentrações de proteínas de fase aguda. Neste período, enquanto as variáveis ultra-sonográficas aumentaram, as concentrações de Hp, GA α 1 e CRP diminuíram.

Nas 3 primeiras semanas de gestação, não há valores a serem correlacionados com as proteínas de fase aguda, pois corresponde ao período anterior à implantação embrionária. Os valores obtidos para Hp e CRP neste primeiro terço da gestação não apresentaram diferenças significativas entre si no grupo G e entre os grupos G e NG, pelo mesmo motivo. Portanto pode-se afirmar que os valores médios encontrados para Hp ($2,46 \pm 1,46$ mg/ml) e para CRP ($7,33 \pm 7,16$ μ g/ml), nas 3 primeiras semanas, não sugerem gestação.

A GA α 1 inicia sua elevação sérica mais tardiamente após o estímulo para sua produção, quando comparada à Hp e à CRP. Portanto esta proteína permaneceu 1 semana a mais (até a 4ª semana) sem apresentar alterações significativas com relação às 3 primeiras semanas do grupo G e com as respectivas semanas do grupo NG. Os intervalos de valores e concentração média para GA α 1, nas 4 primeiras semanas de gestação, foram: 60 a 530 μ g/ml ($219 \pm 76,59$ μ g/ml).

Os valores de Hp na 4ª semana de gestação não diferem estatisticamente das demais semanas, porém apresentaram diferença significativa entre os grupos G e NG, representando ter havido início de elevação nas concentrações séricas desta proteína.

Embora não tenha sido possível localizar a diferença entre as semanas de

gestação para a CRP, a 4ª semana é aparentemente diferente das e 3 primeiras, e apresenta os seguintes valores médios: $38,34 \pm 19,52 \mu\text{g/ml}$.

A 5ª semana de gestação é caracterizada por valores séricos máximos nas 3 proteínas de fase aguda abordadas neste estudo. É significativamente diferente do grupo NG para todas as proteínas e também das 3 primeiras semanas para a Hp das demais semanas do mesmo grupo para a GA α 1 e, aparentemente, das demais semanas para a CRP. Neste estudo, as cadelas que apresentaram valores médios para Hp de $11,11 \pm 1,7 \text{ mg/ml}$, quando abordadas na primeira metade da gestação, estavam com 5 semanas de idade gestacional. Para a GA α 1 e CRP, os valores: $449,44 \pm 146,91 \mu\text{g/ml}$ e $58,30 \pm 14,69 \mu\text{g/ml}$, respectivamente, mensurados a qualquer momento, representaram a 5ª semana de gestação.

A 6ª semana é caracterizada pelo início do declínio nas concentrações médias de Hp, GA α 1 e CRP, sem que haja diferenças significativas entre esta e as semanas seguintes até o parto. O mesmo ocorre com a 7ª, 8ª e 9ª semana para a Hp e a GA α 1.

Aparentemente, a 6ª semana difere da 7ª, 8ª e 9ª semanas de gestação, para a CRP. Sendo assim, poderia se afirmar, na 2ª metade da gestação, que os valores $38,32 \pm 20,25 \mu\text{g/ml}$ referem-se à 6ª semana. As semanas seguintes não apresentaram diferenças entre si.

Com referência às mensurações ultra-sonográficas, DBP, DC e EP, verificou-se que existe diferenças estatísticas entre os valores semanais, mas não foi possível identificar onde se localizavam essas diferenças, devido ao pequeno número de amostras, mas por meio de análise de regressão multivariada, foi possível determinar um modelo que estima a idade gestacional em dias após concentração sérica máxima de LH. O valor obtido poderia ser dividido pelo número 7, resultando em idade gestacional expressa em semanas.

Inflamações agudas de outras causas, tais como infecção (HAYASHI et al., 2001; MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2002; MATIJATKO, 2006), trauma cirúrgico (CONNER; ECKERSALL, 1988) ou neoplasias (McGROTTY et al., 2003), podem causar concentrações séricas médias de proteínas de fase aguda, em geral, maiores que as concentrações máximas observadas durante a gestação. Consequentemente, os resultados deste trabalho, têm valor na avaliação clínica obstétrica ou ginecológica, pois podem sugerir a ocorrência de outras afecções durante a gestação e, quando associados às características ultra-sonográficas do

concepto, contribuir para a estimativa da idade gestacional.

Ao revisar a literatura, não foram encontrados estudos que associem as proteínas de fase aguda à pseudociese e acometimentos inflamatórios e infecciosos no útero de cadelas. Por isso, não se pode afirmar que o perfil das concentrações dessas proteínas auxilie na diferenciação de tais acometimentos.

As concentrações séricas de Hp, GA α 1 e CRP não foram tão bem correlacionadas com a idade gestacional, quanto às mensurações ultra-sonográficas do DBP, DC e EP. No entanto, o conhecimento de sua dinâmica contribui não apenas para caracterização da gestação em cães, mas também como suporte diagnóstico para detectar condições infecciosas durante a gestação, estabelecer possíveis correlações entre o papel dessas proteínas e casos de infertilidades de causa desconhecida e para auxiliar na compreensão de seu papel biológico durante a gestação em cães.

6. Conclusões

6 CONCLUSÕES

Com base nas observações dos resultados deste trabalho, conclui-se que:

1. A ultra-sonografia demonstrou ser um bom método para a realização do diagnóstico precoce da gestação, o qual foi realizado entre o 18º e 21º dias após a concentração sérica máxima de LH.
2. A diferença do número médio de filhotes por ninhada e da duração média da gestação entre as cadelas primíparas e múltíparas não foi significativa.
3. Foi possível dividir o período gestacional em 9 semanas. Cada uma delas, da terceira à nona semana de gestação, foi associada a um determinado conjunto de características ultra-sonográficas no conceito.
4. Das membranas fetais observadas, o saco vitelino foi o mais notavelmente correlacionado com a idade gestacional, porém mais estudos precisam ser realizados para quantificar tal correlação.
5. As mensurações ultra-sonográficas dos parâmetros selecionados neste trabalho (DBP, DC e EP) foram consistentes entre as gestações estudadas. Foram altamente correlacionadas ao número de dias após a concentração sérica máxima de LH, denotando serem bons indicadores de idade gestacional. O DBP foi a variável melhor correlacionada à idade gestacional.
6. É possível estimar a idade gestacional em cadelas da raça boxer por meio da fórmula; $Y = 22,886 + 1,26 \text{ DBP} + 0,107 \text{ DC}$, onde Y = idade gestacional (dias após concentração sérica máxima de LH), DBP = diâmetro biparietal, DC = diâmetro do corpo. Este modelo final apresentou-se altamente significativo ($p < 0001$) com R^2 ajustado de 0,99.

7. As concentrações séricas das proteínas de fase aguda abordadas neste estudo (Hp, GA α 1 e CRP) foram correlacionadas à idade gestacional, em semanas após a concentração sérica máxima de LH. São úteis na estimativa da idade gestacional quando associadas às características ultra-sonográficas da gestação.
8. O número de sítios de implantação embrionária (estimado pelo número de filhotes nascidos) é pouco explicado pela amplitude da resposta de fase aguda, sugerindo que a resposta inflamatória materna não seja consequência da intensidade do estímulo inflamatório dado pelo número de embriões implantados.
9. As concentrações séricas máximas de Hp, GA α 1 e CRP ($11,11 \pm 1,7$ mg/ml; $449,44 \pm 146,91$ μ g/ml e $58,30 \pm 14,69$ μ g/ml) foram atingidas na 5ª semana de gestação.
10. Não foi possível determinar uma fórmula final, considerando apenas as variáveis Hp, GA α 1 e CRP como também todas as variáveis deste estudo (DBP, DC, EP, Hp, GA α 1 e CRP) para estimativa da idade gestacional, pois quando foram colocadas no modelo multivariado, perderam sua significância.
11. Foi possível ilustrar a dinâmica das proteínas e fase aguda (Hp, GA α 1 e CRP) e das mensurações ultra-sonográficas (DBP, DC e EP) durante a gestação em cadelas da raça boxer, por meio da Tabela 15 e seu respectivo Gráfico 22, ilustrados na página 83.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALLEN, W. E.; MEREDITH, M. J. Detection of pregnancy in the bitch: a study of abdominal palpation, A-mode ultrasound and Doppler ultrasound techniques. **Journal of Small Animal Practice**, v. 22, p. 609-622, 1981.
- ALMEIDA, A. H. **Estimativa do dia do parto em cadelas da raça boxer por meio de mensurações ultra-sonográficas no conceito**. 2002. 99 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- BAUMANN, H.; GAUDIE, J. Regulation of acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. **Molecular Biology & Medicine**, v. 7, p. 147-159, 1990.
- BECCAGLIA, M.; LUVONI, G. C. Ultrasonographic study during pregnancy of the growth of the encephalic portion in the canine foetus. **Veterinary Research Communications**, v. 28, p. 161-164, 2004. Supplement 1.
- BONDESTAM, S.; ALITALO, I.; KARKKAINEN, M. Real-time ultrasound pregnancy diagnosis in the bitch. **Journal of Small Animal Practice**, v. 24, p. 145-151, 1983.
- BREMNER, K. C. Studies on haptoglobin and haemopexin in the plasma of cattle. **The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 42, p. 643-656, 1964.
- BYSTED, B. V.; DIELEMAN, S. J.; HYTTTEL, P.; GREVE, T. Embryonic development stages in relation to the LH peak in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 181-186, 2001.
- CAPSI, D.; BALTZ, M. L.; SNEL, F.; GRUYS, E.; NIV, D.; BATT, R. M.; MUNN, E. A.; BUTTRESS, N.; PEPYS, M. B. Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. **Immunology**, v. 53, p. 307-313, 1984.
- CAPSI, D.; SNEL, F. W.; BATT, R. M.; BENNETT, D.; RUTTEMANN, G. R.; HARTMAN, E. G.; BALTZ, M. L.; GRUYS, E.; PEPYS, M. B. C-reactive protein in dog. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, p. 919-921, 1987.
- CARTEE, R. E.; ROWLES, T. Preliminary study of the ultrasonographic diagnosis of pregnancy and fetal development in the dog. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 1259-1265, 1984.
- CERON, J.J.; ECKERSALL, P. D.; MARTYNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.
- CHAVATTE-PALMER, P.; SOUZA, N.; LAIGRE, P.; CAMOUS, S.; PONTER, A. A.; BECKERS, J. F.; HEYMAN, Y. Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying

somatic clones. **Theriogenology**, v. 66, p. 829-840, 2006.

CHAVEZ, M. J.; STEINMANN, C. C.; BICKHARDT, K. Fetal heart rate measurement and sonographic fetometry for determination of fetal age in sheep. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 103, n. 11, p. 478-480, 1996.

CONCANNON, P. W. Canine pregnancy: predicting Parturition and timing events of gestation. In: RECENT ADVANCES IN SMALL ANIMAL REPRODUCTION. International Veterinary Information Service. A1202.0500. Disponível em: <<http://www.ivl.org>>. Acesso em: 17 set 2000.

CONCANNON, P. W.; GIMPEL, T.; NEWTON, L.; CASTRACANE, V. D. Postimplantation increase in plasma fibrinogen concentration with increase in relaxine concentration in pregnant dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 9, p. 1382-1385, 1996.

CONCANNON, P.; TSUTSUI, T.; SHILLE, T. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 169-179, 2001.

CONCANNON, P.; WHALEY, S.; LEIN, D.; WISSLER, R. Canine gestation length: variation related to time of mating and fertile life of sperm. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 10, p. 1819-1821, 1983.

CONNER, J. G.; ECKERSALL, P. D.; FERGUSON, J.; DOUGLAS, T. A. Acute phase response in the dog following surgical trauma. **Research in Veterinary Science**, v. 45, n. 1, p. 107-110, 1988.

COOPER, E. H.; WARD, A. H. Acute phase reactant proteins as aids to monitoring disease. **Investigative & Cell Pathology**, v. 2, p. 293-301, 1979.

DAVIDSON, A. P.; NYLAND, T. G.; TSUTSUI, T. Pregnancy diagnosis with ultrasound in the domestic cat. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 27, n. 4, p. 109-114, 1986.

ECKERSALL, P. D.; CONNER, J. G. Bovine and canine acute phase proteins. **Veterinary Research Communications**, v. 12, n. 2-3, p. 169-178, 1988.

ECKERSALL, P. D.; HARVEY, M. J.; FERGUSON, J. M.; RENTON, J. P.; NICKSON, D. A.; BOYD, J. S. Acute phase proteins in canine pregnancy (*Canis familiaris*). **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 47, p. 159-164, 1993.

ECKERSALL, P. D.; SAINI, P. K.; MCCOMB, C. The acute phase response of acid soluble glycoprotein, alpha (1)-acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-reactive protein, in the pig. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 51, n. 3-4, p. 377-385, 1996.

EILTS, B. E.; DAVIDSON, A. P.; HOSGOOD, G.; PACCAMONTI, D. L.; BAKER, D. G. Factors affecting gestation duration in the bitch. **Theriogenology**, v. 64, n. 2, p. 242-251, 2005.

ENGLAND, E.; CONCANNON, P. W. Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations. In: **RECENTS ADVANCES IN SMALL ANIMAL REPRODUCTION**. International Veterinary Information Service, Ithaca NY. A1231.0602. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 10 out 2002.

ENGLAND, G. C. W. Ultrasonographic assessment of abnormal pregnancy. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 28, n. 4, p. 849-868, 1998.

ENGLAND, G. L. W.; ALLEN, W. E.; PORTER, D. J. Studies on canine pregnancy using B-mode ultrasound: development of the conceptus and determinations of gestational age. **Journal of Small Animal Practice**, v. 31, p. 324-329, 1990.

ENGLER, R. Acute-phase proteins in inflammation. **Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales**, v. 189, n. 4, p. 563-568, 1995.

EVANS, H. E. **Miller's anatomy of the dog**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1993, 1113 p.

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

GRUYS, E.; OBWOLO, M. J.; TOUSSAINT, M. J. M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. **The Veterinary Bulletin**, v. 64, p. 1009-1018, 1994.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University SCIENCE**, v. 6B, n. 11, p. 1045-1056, 2005.

GRUYS, E.; VANEDEREN, A. M.; ALSEMGEEEST, S. P. M.; KALSBECK, H. C.; WENSING, T. Acute-phase protein values in blood of cattle as indicator of animals with pathological processes. **Archiv Fur Lebensmittelhygiene**, v. 44, p. 107-109, 1993.

HARVEY, J. W. Quantitative determinations of normal horse, cat and dog haptoglobins. **Theriogenology**, v. 6, n 2-3, p.133-138, 1976.

HASE, M.; HORI, T.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis sistem in dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 3, p. 243-248, 2000.

JOHNSON, R. W. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines; an integrated view. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1244-1255, 1997.

KÄHN, W. Sonographic fetometry in the bovine. **Theriogenology**, v. 31, n. 5, p. 1105-1121, 1989.

KÄHN, W.; FRAUNHOLZ, J.; KASPAR, B.; PYCZAC, K. Sonographic diagnosis of early pregnancy in horses, cattle, sheep, goats, swine, dogs and cats. Standard

values and limitations. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v. 1, p. 103, 1990.

KAUFFOLD, J.; RICHTER, A.; SOBIRAJ, A. Results and experiences of a two-year investigations in the use of sonographic pregnancy control in sows at different stages of getation. **Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere**, v. 25, n. 5, p. 429-437, 1997.

KENT, J. E.; GOODALL, J. Assessment of an immunoturbidimetric method for measuring equine serum haptoglobin concentrations. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, p. 59-66, 1991.

KNEE, W. R.; JANDL, J. H. The sites of hemoglobin catabolism. **Blood**, v. 26, p. 705-718, 1965.

KURIBAYASHI, T.; SHIMADA, T.; MATSUMOTO, M.; KAWATO, K.; HONJYO, T.; FUKUYAMA, M.; YAMAMOTO, Y.; YAMAMOTO, S. Determination of serum reactive C-protein in healthy beagles dogs of various ages and pregnant beagle dogs. **Experimental Animals**, v. 52, n. 5, p. 387-390, 2003.

KURIBAYASHI, T.; SHIMIZU, M.; SHIMADA, T.; HONJYO, T.; YAMAMOTO, Y.; KUBA, K.; YAMAMOTO, S., Alpha 1-acid glycoprotein (AAG) levels in healthy and pregnant beagle dogs. **Experimental Animals**, v. 52, n. 5, p. 377 a 381, 2003.

KUTZLER, M. A.; MOHAMMED, H. O.; LAMBS, S. V.; MEYERS-WALLEN, V. N. Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. **Theriogenology**, v. 60, n. 6, p. 1187-1196, 2003.

KUTZLER, M. A.; YEAGER, A. E.; MOHAMMED, H. O.; MEYERS-WALLEN, V. N. Accuracy of canine parturition date prediction using fetal measurements obtained by ultrasonography. **Theriogenology**, v. 60, n. 7, p. 1309-1317, 2003.

LAURELL, C. B.; NYMANN, M. Studies on the serum haptoglobin level in hemoglobinemiae and its influence on renal excretion of hemoglobin. **Blood**, v. 12, p. 493-506, 1957.

LEE, S. Y.; ANDERSON, J. W.; SCOTT, G. L.; MOSSMANN, H. W. Ultraestructure of the placenta and fetal membranes of the dog: II. The Yolk Sac. **The American Journal of Anatomy**, v. 166, p. 166-313, 1983.

LORIOT, N.; MARTINOT, S.; FRANK, M. **Ecografia abdominal del perro y el gato**. Barcelona: Masson, 1997. 140 p.

LUVONI, G.; GRIONI, A. Determination of gestational age in medium and small size bitches using ultrasonography fetal measurements. **Jouranl of Small Animal Practice**, v. 41, n. 7, p. 292-294, 2000.

MARINAC-DABIC, D.; KRULEWITCH, C. J.; MOORE JR., R. M. The safety of prenatal ultrasound exposure in human studies. **Epidemiology**, v. 13, n. 3, p. 19-22, may 2002.

MARTINEZ, M. F.; BOSH, P.; BOSH, R. A. Determination of early pregnancy and

embryonic growth in goats by transrectal ultrasound scanning. **Theriogenology**, v. 49, n. 8, p. 1555-1565, 1998.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; CERÓN, J. J. Critical differences of acute phase proteins in canine serum samples. **The Veterinary Journal**, v. 166, p. 233-237, 2002.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; ECKERSALL, P. D.; CERÓN, J. J. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. **The Veterinary Record**, v. 150, p. 241-244, 2002.

MATIJATKO, V.; MRLJAK, V.; KIS, I.; KUCER, N.; FORSEK, J.; ZIVICNJAK, T.; ROMIC, Z.; SIMEC, Z.; CERÓN, J. J. evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. **Veterinary Parasitology**. In Press.

MAURY, C. P. J. Monitoring the acute phase response: comparison of tumor necrosis factor (cachectin) and C-reactive protein responses in inflammatory and infectious diseases. **Journal of Clinical Pathology**, v. 43, p. 1078-1082, 1989.

McGROTTY, Y. L.; KNOTTENBELT, C. M.; RAMSEY, I. K.; REID, S. W.; ECKERSALL, P. D. Haptoglobin concentrations in a canine hospital population. **The Veterinary Record**, v. 152, n. 18, p. 562-564, 2003.

MIGLINO, M. A.; AMBROSIO, C. A.; MARTINS, D. S.; WENCESLAU, C. V.; PFARRER, C.; LEISER, R. The carnivore pregnancy: The development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology**, v. 66, p. 1699-1702, 2006.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 28-40, 2004.

NIELSEN, F. R.; BEK, K. M.; RASMUSSEN, P. E.; QVIST, I.; TOBIASSEN, M. C-reactive protein during normal pregnancy. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 35, n. 1, p. 23-27, 1990.

NODEN, D. M.; LAHUNTA, A. **Embriología de los animales domésticos**. Zaragoza: Acribia, 1990. 399 p.

NYLAND, T. G.; MATTON, J. S. **Veterinary diagnostic ultrasound**. Philadelphia: W. B. Saunders, 2002, p. 231.

OKKENS, A. C.; HEKERMAN, T. W.; DE VOGEL, J. W.; VAN HAAFTEN, B. Influence of litter size and breed on variation in length of gestation in the dog. **The Veterinary Quarterly**, v. 15, n. 4, p. 160-161, 1993.

OKKENS, A. C.; TEUNISSEN, J. M.; VAN OSCH, W.; VAN DEN BROWN, W. E.; DIELEMAN, S. J.; KOOISTRA, H. S. Influence of litter size and breed on the duration of gestation in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 193-197, 2001. Supplement.

PELTOLA, H. O. C-reactive protein for rapid monitoring of infections of the central nervous system. **Lancet**, v. 1, p. 980-982, 1982.

- PETER, A. T.; JAKOVLJEVIC, S. Real-time ultrasonography of the small animal reproductive organs. **Continuing Education**, v. 14, n. 6, p. 739-746, 1992.
- PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, p. 163-187, 2004.
- PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; JENSEN, A. L.; HEEGAARD, P. M. H. Evaluation of an enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) for determination of porcine haptoglobin. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 48, p. 513-523, 2001.
- PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonography for detection of pregnancy and study of embryonic development in heifers. **Theriogenology**, v. 22, n. 2, p. 225-233, 1984.
- PIPERS, F. S.; ZENT, W.; HOLDER, R.; ASBURY, A. Ultrasonography as an adjunct to pregnancy assessments in the mare. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 184, n. 3, p. 328-334, 1984.
- PURSWELL, B. J. Management of apparent luteal insufficiency in a bitch. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 199, n. 7, p. 902-903, 1991.
- ROMANUCCI, D. Placentation in the dog. **The Anatomical Record**, v. 108, p. 562, 1950.
- ROOT-KUSTRITZ, M. V. Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 755-765, 2005.
- SAUNDERS, H. M. The role of ultrasound in canine reproduction. **Problems in Veterinary Medicine**, v. 4, n. 3, p. 499-504, 1992.
- SERGEEV, L.; KLEEMAN, D. O.; WALKER, S. K.; SMITH, D. H.; GROSSER, T. I.; MANN, T.; SEAMARK, R. F. Real-time ultrasound imaging for predicting ovine fetal age. **Theriogenology**, v. 34, n. 3, p. 593-601, 1990.
- SHILLE, V. M.; GONTAREK, J. The use of ultrasonography for pregnancy diagnosis in the bitch. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 187, p. 1021-1025, 1985.
- SKINNER, J. G. International standartization of acute phase proteins. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 30, n. 1, p. 2-7, 2001.
- SOLTER, P. F.; HOFFMANN, W. E.; HUNGERFORD, L.; SIEGEL, J. P.; DENIS, S. H. S.; DORNER, J. L. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 10, p. 1738-1742, 1991.
- SON, C.; JEONG, K.; KIM, J.; PARK, I.; KIM, S.; LEE, C. Establishment of the prediction table of parturition day with ultrasonography in small pet dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 7, p. 715-721, 2001.

SPSS base 14.0. Chicago: SPSS Inc., 2006. 1 CD – ROM.

THOMPSON, D.; MILFORD-WARD, A.; WHICHER, J. The value of acute phase measurements in clinical practice. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 29, p. 123-131. 1992.

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

WHICHER, J. T.; WESTACOTT, C. I. The acute phase response. In: WHICHER, J. T.; EVANS, S. W. (Ed.). **Biochemistry of inflammation**. London: Kluwer Academic, 1992. p. 243-271.

YAMAMOTO, S.; SHIDA, T.; HONDA, M.; ASHIDA, Y.; RIKIHISA, Y.; ODAKURA, M.; HAYASHI, S.; NOMURA, M.; ISAYAMA, Y. Serum C-reactive protein and immune responses in dogs inoculated with *Bordetella bronchiseptica* (Phase I cells). **Veterinary Research Communications**, v. 18, p. 347-357, 1994.

YAMAMOTO, S.; SHIDA, T.; MIYAJI, S.; SANTSUKA, H.; FUGISE, H.; MUKAWA, K.; FURUKAWA, E.; NAGAE, T.; NAIKI, M. Changes in serum C-reactive proteins levels in dogs with various disorders and surgical traumas. **Veterinary Research Communications**, v. 17, p. 85-93, 2003.

YAMAMOTO, S.; SHIDA, T.; OKIMURA, T.; OTABE, K.; HONDA, M.; ASHIDA, Y.; FURUKAWA, E.; SARIKAPUTI, M.; NAIKI, M. Determination of C-reactive protein in serum and plasma from healthy dogs and dogs with pneumonia by ELISA and slide reversed passive latex agglutination test. **The Veterinary Quarterly**, v. 16, p. 74-77, 1994.

YAMASHITA, K.; FUGINAGA, T.; MIYAMOTO, T.; HAGIO, M.; IZUMIZAWA, Y.; KOTANI, T. Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 56, p. 487-492, 1994.

YEAGER, A. E.; MOHAMMED, H. O.; MEYERS-WALLEN, V.; VANNERSON, L.; CONCANNON, P. W. Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus and fetal membranes throughout accurately timed pregnancy in beagles. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 3, p. 342-351, 1992.