FÁBIO NOVELLI MARTORELLI

Caracterização da anemia em cadelas com piometra

São Paulo
2016

FÁBIO NOVELLI MARTORELLI

Caracterização da anemia em cadelas com piometra

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Profª Drª Mitika Kuribayashi Hagiwara

São Paulo

2016

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3243
FMVZ

Martorelli, Fábio Novelli
Caracterização da anemia em cadelas com piometra / Fábio Novelli Martorelli. -- 2015.
70 f. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

.

Orientador: Prof.ª Dr.ª Mitika Kuribayashi Hagiwara.

1. Piometra. 2. Anemia hemolítica. 3. imunomediada. 4. Cadelas. 5. Citometria de fluxo. I. Título.

ERRATA

MARTORELLI, F. N. **Caracterização da anemia em cadelas com piometra.** 2016. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Página	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	1. Piometra. 2. Anemia hemolítica. 3. imunomediada. 4. Cadelas. 5. Citometria de fluxo.	1. Piometra. 2. Anemia hemolítica imunomediada. 3. Cadelas. 4. Citometria de fluxo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização da anemia em cadelas com piometra", protocolado sob o nº 3062/2013, utilizando 100 (cem) cães, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Characterization of anemia in bitches with pyometra", protocol number 3062/2013, utilizing 100 (one hundred) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, was approved in the meeting of day 8/14/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 14 de agosto de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MARTORELLI, Fábio Novelli

Título: **Caracterização da anemia em cadelas com piometra**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do titulo de Mestre em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

Esta dissertação é dedicada à minha família, especialmente ao seu mais novo membro: Cauê.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Decio e Rosângela, por estarem sempre ao meu lado, acreditando em mim e possibilitando a realização do meu sonho de me tornar Médico Veterinário. Obrigado por todo o amor e confiança depositados em mim. Amo vocês.

Às minhas irmãs, Fabiana e Juliana, por fazerem parte da minha vida. Nem preciso dizer o imenso orgulho que sinto em ter o mesmo sangue de vocês. Obrigado por sempre estarem prontas a me ajudar!

À minha esposa, Patrícia, por tudo o que faz por mim diariamente. Responsável por me proporcionar momentos imensuráveis de alegria e por se mostrar tão forte nos momentos difíceis. É simplesmente incrível dividir a minha vida com você.

Ao meu filho, Cauê, simplesmente por ser o meu filho. Amor incondicional e indescritível. Seja bem-vindo à nossa louca vida.

Aos meus sobrinhos e cunhado, Guilherme, Rafael e Marcelo, por completarem esta família tão forte e unida.

Às minhas amigas (irmãs) de tantos anos, Daniela e Ana Paula, pela amizade e irmandade!

À equipe do Laboratório Veterinário de Patologia Clínica do VCM/USP (Maria Helena, Samantha, Cláudia, Marli, Clara e Edna), pelo apoio técnico para a confecção desta dissertação. Agradeço também pela amizade, simpatia e por fazerem me sentir em casa ao longo dessa jornada.

À equipe do setor de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital Veterinário/USP, principalmente, à Profª Drª Clair, Marcelo e Mariana, pela inestimável colaboração para a realização desta dissertação.

Aos professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por compartilharem os seus conhecimentos e por me acolherem tão bem nessa Faculdade. Muito obrigado!

E para finalizar, o meu agradecimento especial à minha orientadora Profª Drª Mitika Kuribayashi Hagiwara. Muito obrigado pela confiança depositada em mim. Obrigado pelos desafios propostos e por sempre tentar obter o meu melhor. Obrigado pela dedicação e por ser a pessoa responsável pelo meu desenvolvimento científico. Tenho muito respeito e admiração pelo seu impecável profissionalismo e conhecimento. Muito obrigado pela oportunidade!

“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros foram.**”**

Alexander Graham Bell

RESUMO

MARTORELLI, F. N. **Caracterização da anemia em cadelas com piometra.** [Characterization of anemia in bitches with pyometra]. 2016. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A piometra é uma condição mórbida caracterizada pela inflamação do útero com acúmulo de exsudatos, resultante de ações hormonais e geralmente associada à presença de bactérias no lúmen uterino. A anemia é a alteração hematológica mais frequentemente observada em cadelas com piometra e está associada à cronicidade da doença, diminuição da eritropoiese, devido ao efeito toxêmico na medula óssea, diminuição da disponibilidade de ferro ou perda de sangue para o útero. Adicionalmente, o efeito das toxinas bacterianas e os radicais livres gerados pelo metabolismo oxidativo dos neutrófilos podem resultar na modificação da estrutura antigênica da membrana do eritrócito, permitindo a ligação de imunoglobulinas em sua superfície e acelerando a destruição eritrocitária. Essa hipótese pode ser comprovada pela detecção de imunocomplexos na superfície eritrocitária de cadelas com piometra. O diagnóstico de piometra foi estabelecido em 33 cadelas atendidas no Serviço de Obstetrícia/Ginecologia do Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo com base na anamnese, exame físico e exames subsidiários (ultrassonografia, hemograma e concentrações séricas de ureia e creatinina). As amostras sanguíneas foram coletadas em dois momentos. A primeira anterior a ovariosalpingohisterectomia (OSH) e a segunda, sete a dez dias após a OSH. A quantificação de hemácias com deposição de imunocomplexos IgG e IgM foi realizada utilizando-se anticorpos anti-IgG e anti-IgM (Bethyl® Laboratories) conjugadas a fluoresceína de isotiocianato (FITC), e a leitura realizada com citômetro de fluxo (FACS Calibur; Becton, Dickinson and Company© 2007 BD), sendo os resultados expressos em percentual de hemácias marcadas. Foram utilizados o Teste de Shapiro-Wilk para a avaliação da distribuição de dados e a comparação entre os grupos controle, pré e pós-OSH foi realizada valendo-se do Teste t ou Teste t pareado e Correlação de Pearson, e do Teste U de Mann-Whitney e Correlação de Spearman, para as variáveis com distribuição normal e não-normal, respectivamente. O valor de alfa estipulado foi de 0,05. Analisando os valores hematológicos de cada um dos cães incluídos no estudo, observa-se que 19 (57,6%)

apresentavam anemia normocítica normocrômica não regenerativa no momento pré-OSH e cinco (15,2%) no momento pós-OSH. Em cães do grupo controle foram observadas 0,14 – 0,77% (0,43±0,18%) de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC e 0,29 – 9,58% (0,68±0,29%) para anticorpos anti-IgM FITC. Já nos cães com piometra, foram encontradas 0,14 – 4,19% (0,96±0,86%) de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC e 0,29 – 9,58% (1,37±1,71%) com anticorpos anti-IgM FITC, antecedendo a OSH. No momento pós-OSH observou-se 0,18 – 16,2% (2,77±3,67%) de hemácias marcadas para anticorpos anti-IgG FITC e 0,15 – 19,8% (4,01±4,46%) para anticorpos anti-IgM FITC. O percentual de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC diferiu entre os grupos controle e piometra, pré-OSH ($p<0,001$) e pós-OSH ($p<0,001$). Em relação a anticorpos anti-IgM FITC, não foram observadas diferenças entre os grupos controle e pré-OSH ($p=0,09$), porém, após a OSH houve aumento na marcação de hemácias, quando comparado ao grupo controle ($p<0,001$). Apenas alguns animais apresentaram mais de 5% de hemácias marcadas, e isto ocorreu, principalmente, no momento pós-OSH. Entretanto, não resultou no agravamento da anemia, indicando que a piometra em cadelas está associada à deposição de imunoglobulinas G ou M na superfície das hemácias, sem, no entanto, promover hemólise ou agravamento da anemia.

Palavras-chave: Piometra. Anemia hemolítica imunomediada. Cadelas. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

MARTORELLI, F. N. **Characterization of anemia in bitches with pyometra.** [Caracterização da anemia em cadelas com piometra]. 2016. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The pyometra is a morbid condition characterized by inflammation of the uterus with exudates accumulation resulting from hormonal action and usually associated with the presence of bacteria in the uterine lumen. Anemia is the hematologic changes most frequently observed in bitches with pyometra and is associated with chronic disease, diminished erythropoiesis due to toxemic effect on the bone marrow, decreased iron availability or loss of blood to the uterus. Additionally, the effect of bacterial toxins and free radicals generated by neutrophil oxidative metabolism may result in the modification of antigenic structure of the erythrocyte membrane, allowing the binding of immunoglobulins on their surface and accelerating erythrocyte destruction. This hypothesis can be confirmed by detection of immune complexes in the erythrocyte surface dogs with pyometra. The diagnosis of pyometra was established in 33 dogs attended by the Obstetrics Service/Gynecology of Veterinary Hospital of the University of São Paulo based on history, physical examination and additional tests (ultrasound, blood count and serum concentrations of urea and creatinine). Blood samples were collected in two stages. The first prior to ovariohysterectomy (OSH) and the second, seven to ten days after OSH. Quantification of erythrocyte with deposition of IgG and IgM immune complexes was performed using antibodies anti-IgG and anti-IgM (Bethyl® Laboratories) conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), and the reading performed with flow cytometry (FACS Calibur; Becton, Dickinson and Company© 2007 BD), and the results expressed as a percentage of red blood cells marked. The Shapiro-Wilk test was used to assess the distribution of data and the comparison between the control group, pre- and post-OSH was carried out making use of the t test or paired t test and Pearson correlation, and test U Mann-Whitney and Spearman correlation for the variables with normal and non-normal distribution, respectively. The stipulated alpha value was 0.05. The analysis of the hematological values of each of the dogs enrolled in the study, it was observed that 19 (57.6%) with anemia normocytic normochromic non-regenerative in the pre-OSH moment and 5 (15.2%) in the post-

OSH moment. In control group of dogs were observed from 0.14 to 0.77% (0.43 ± 0.18%) of red blood cells marked with antibodies anti-IgG FITC and 0.29 to 9.58% (0.68 ± 0.29%) for antibodies anti-IgM FITC. Already in dogs with pyometra were found 0.14 to 4.19% (0.96 ± 0.86%) of red blood cells marked with antibodies anti-IgG FITC and 0.29 to 9.58% (1.37 ± 1.71%) with antibodies anti-IgM FITC, prior to OSH. In the post-OSH time it was observed 0.18 to 16.2% (2.77 ± 3.67%) of red blood cells marked for antibodies anti-IgG FITC and 0.15 to 19.8% (4.01 ± 4.46%) for antibodies anti-IgM FITC. The percentage of red blood cells marked with antibodies anti-IgG FITC differ between groups control and pyometra, pre-OSH ($p<0.001$) and post-OSH ($p<0.001$). Regarding the antibodies anti-IgM FITC, no differences were observed between the control and pre-OSH ($p=0.09$), however, after the OSH was no increase in labeling of red blood cells compared to the control group ($p<0.001$). Only a few animals have more than 5% of marked red blood cells, and this was mainly in the post-OSH time. However, not result in the worsening of anemia, indicating that pyometra in dogs is related to the deposition of immunoglobulin G or M on the surface of erythrocytes, without, however, promote hemolysis or worsening of anemia.

Keywords: Pyometra. Immune mediated hemolytic anemia. Bitches. Flow cytometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo esquemático dos fatores envolvidos na patogênese do Complexo HEC-piometra 24

Figura 2 - Diagrama de caixas (Box *plot*) representando as variações dos valores do hematócrito dos Grupos Controle e Piometra nos momentos pré-operatório e pós-operatório. São Paulo - 2014–2015..... 39

Figura 3 - Diagrama de caixas (Box *plot*) representando as variações do número total de hemácias dos Grupos Controle e Piometra nos momentos pré-operatório e pós-operatório. São Paulo - 2014–2015..... 40

Figura 4 - Diagrama de caixas (Box *plot*) da porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC dos Grupos Controle e Piometra nos momentos pré-operatório e pós-operatório. São Paulo - 2014–2015 43

Figura 5 - Diagrama de caixas (Box *plot*) da porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgM FITC dos Grupos Controle e Piometra nos momentos pré-operatório e pós-operatório. São Paulo - 2014–2015 44

Figura 6 - Matriz de correlação do Grupo Piometra no momento pré-operatório. São Paulo - 2014..... 45

Figura 7 -Matriz de correlação do Grupo Piometra no momento pós-operatório. São Paulo - 2014..... 46

Quadro 1 - Classificação das AHIM 29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos cães do grupo controle e de cães com piometra, de acordo com a definição racial. São Paulo - 2014–2015 37

Tabela 2 - Valores médios, mediana, mínimo e máximo, primeiro quartil e terceiro quartil, e desvio padrão da média das variáveis hematológicas dos cães do Grupo Controle. São Paulo - 2014–2015 38

Tabela 3 - Valores médios, mediana, mínimo e máximo, primeiro quartil e terceiro quartil, e desvio padrão da média das variáveis hematológicas dos cães do Grupo Piometra no momento pré-operatório. São Paulo - 2014 38

Tabela 4 - Valores médios, mediana, mínimo e máximo, primeiro quartil e terceiro quartil, e desvio padrão da média das variáveis hematológicas dos cães do Grupo Piometra no momento pós-operatório. São Paulo - 2014 39

Tabela 5 - Valores individuais, média, mediana, valores mínimo e máximo, primeiro e terceiro quartis e desvio padrão da média do percentual de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC e anti-IgM FITC dos cães pertencentes ao Grupo Controle. São Paulo - 2014–2015 41

Tabela 6 - Valores individuais, média, mediana, valores mínimo e máximo, primeiro e terceiro quartis e desvio padrão da média do percentual de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC e anti-IgM FITC dos cães pertencentes ao Grupo Piometra nos momentos pré-operatório e pós-operatório. São Paulo - 2014 42

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Dados Gerais dos animais do Grupo Controle. São Paulo 2014 - 2015 57
APÊNDICE B - Dados hematológicos dos animais do Grupo Controle. São Paulo 2014 - 2015 58
APÊNDICE C - Dados Gerais dos animais do Grupo Piometra. São Paulo 2014 59
APÊNDICE D - Dados Hematológicos da primeira coleta (pré-operatório) dos animais do Grupo Piometra. São Paulo 2014 60
APÊNDICE E -Dados Hematológicos da segunda coleta (pós-operatório) dos animais do Grupo Piometra. São Paulo 2014 62
APÊNDICE F - Valores absolutos de reticulócitos do Grupo Piometra. São Paulo 2014 64

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....66

ANEXO B - Ficha de Anamnese preenchida durante atendimento dos animais no Serviço de Obstetrícia / Ginecologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ da Universidade de São Paulo 68

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH – Hormônio Antidiurético

AHIM – Anemia Hemolítica Imunomediada

AST – Aspartato amino transferase

CHCM – Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média

dl – Decilitro

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

FA – Fosfatase Alcalina

FITC – Fluoresceína de Isotiocianato

fl – Fentolitro

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

g – Gramas

Hb – Hemoglobina

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

He – Hemácias

HEC – Hiperplasia Endometrial Cística

Ht – Hematócrito

Hovet – Hospital Veterinário

Idd - Idade

Ig – Imunoglobulina

LPS – Lipopolissacarídeo

ml – Mililitro

mm^3 - Milímetro Cúbico

µl – Microlitro

NaCl – Cloreto de Sódio

OSH - Ovariosalpingohisterectomia

pg – Picograma

SRD – Sem Raça Definida

VCM – Volume Corpuscular Médio

% - Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **20**

2 REVISÃO DE LITERATURA **22**

2.1 A PIOMETRA 22
2.2 A ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA 27
2.2.1 As principais imunoglobulinas envolvidas na AHIM. 29
2.2.2 A Detecção de Imunoglobulinas por Citometria de Fluxo. 30

3 HIPÓTESE **31**

4 OBJETIVO **32**

5 MATERIAIS E MÉTODOS **33**

5.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS 33
5.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS 34
5.3 HEMOGRAMA 34
5.4 BIOQUÍMICA SÉRICA 35
5.5 DETERMINAÇÃO DE IgG E IgM NA SUPERFÍCIE DOS ERITRÓCITOS 35
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 36

6 RESULTADOS **37**

7 DISCUSSÃO **47**

6 CONCLUSÃO **50**

REFERÊNCIAS **51**

APÊNDICES **56**

ANEXOS **65**

1 INTRODUÇÃO

A piometra é uma enfermidade que ocorre geralmente na fase de diestro em cadelas adultas, caracterizada pela produção e acúmulo de secreção purulenta de natureza infecciosa no útero (FELDMAN, 2004). Ela faz parte do Complexo Hiperplasia Endometrial Cística (HEC), e está correlacionada a altos níveis de estrógeno e exposição prolongada a progesterona, seja ela endógena ou exógena (HAGMAN, 2012).

Segundo Nelson e Couto (2006), o estrógeno aumenta o número de receptores de progesterona no útero, levando a uma resposta exagerada, prolongada e inadequada deste hormônio. Este aumento resulta em hiperplasia endometrial cística, promovendo assim o acúmulo de líquido no interior das glândulas endometriais e lúmen uterino. Esta condição proporciona um excelente ambiente para o crescimento bacteriano, que se torna ainda mais facilitado e exacerbado pela inibição da resposta leucocitária do útero (FELDMAN, 2004).

Geralmente, as bactérias de origem vaginal são as responsáveis pela colonização do útero. Quando ocorre relaxamento da cérvix durante o proestro, é permitida a entrada de microrganismos na luz uterina. A *Escherichia coli* é o agente mais frequentemente isolado (COGAN, 2004). Isso se deve a habilidade desta bactéria em se aderir a sítios antigênicos específicos no endométrio e no miométrio sob estimulação da progesterona (NELSON; FELDMAN, 1986).

A piometra pode ocorrer em cadelas jovens com menos de seis anos de idade, devido ao uso de estrógenos e progesterona. Em cadelas com mais idade, a piometra é resultante da longa e repetida estimulação pela progesterona na fase lútea, como descrito em 2001 por Johnston et al.

As principais manifestações clínicas incluem inapetência parcial ou completa, letargia, desidratação, febre, polidipsia e vômito. O útero normalmente está palpável e aumentado, principalmente se a cérvix estiver fechada. Aliadas as alterações clínicas, podem ser observadas alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas, dependendo do estado evolutivo do processo e das condições clínicas do animal (NELSON; COUTO, 2006).

Em relação ao eritrograma, cita-se a ocorrência de anemia discreta a moderada na grande maioria dos casos, principalmente nos casos mais graves e crônicos (BARROS et al., 2005; EMANUELLI, 2007). Segundo Thrall (2007), o metabolismo oxidativo dos neutrófilos leva a um aumento no consumo de oxigênio, gerando substâncias altamente oxidantes. Esses produtos gerados são de extrema importância para a função bactericida dos neutrófilos e destruição do tecido inflamatório. Embora esses metabólitos sejam necessários para o mecanismo de defesa do organismo, a formação de radicais livres pode modificar a estrutura antigênica da membrana do eritrócito, permitindo assim, a ligação de imunoglobulinas, resultando em destruição eritrocitária. Esses metabólitos são considerados como potenciais fatores de destruição dos eritrócitos, embora Emanuelli (2007) tenha concluído que apesar do estresse oxidativo sistêmico, não há interferência no sistema redox intraeritrocitário, não havendo assim, maior suscetibilidade a lise.

Embora ainda não haja comprovação, a destruição imunomediada dos eritrócitos é uma hipótese que merece investigação, por ser a piometra uma condição mórbida em que há alterações hormonais e imunológicas (TIZARD, 2004). A fixação de imunoglobulinas (IgG e IgM) na membrana eritrocitária, pode resultar na destruição precoce destas células. Morley et al. (2008) observou que cães anêmicos com doenças infecciosas têm maior risco de desenvolver anticorpos anti-eritrocitários, constituindo-se na segunda maior causa de anemia hemolítica imunomediada, logo depois das causas idiopáticas ou primárias.

Desta forma, este estudo tem a finalidade de determinar se o aumento da estimulação antigênica, causada pela piometra, pode acarretar a destruição precoce dos eritrócitos, levando o animal a uma condição anêmica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A PIOMETRA

A piometra é a condição patológica que mais acomete o trato genital de cadelas adultas de meia idade e não castradas na Clínica de Pequenos Animais (FELDMAN, 2004; EMANUELLI, 2007; HAGMAN, 2012). É caracterizada pela inflamação do útero com acúmulo de exsudatos, decorrente de ações hormonais e geralmente associada a presença bactérias no lúmen uterino (NELSON; COUTO, 2006). Essa associação de fatores tem sido chamada de Complexo Hiperplasia Endometrial Cística (HEC).

Como descrito por Dow (1957), as sinonímias mais comuns desta afecção são: endometrite purulenta, endometrite catarral, piometrite, endometrite cística crônica, metrite crônica, endometrite purulenta crônica. O mesmo autor classifica o Complexo Hiperplasia Endometrial Cística – Piometra de acordo com as alterações histológicas:

- estágio I (não complicada): há uma hipertrofia glandular associada à presença de cistos de até 1 centímetro de diâmetro. Neste estágio não há presença de reação inflamatória;

- estágio II (complicada): há um processo inflamatório caracterizado pela presença de células plasmocitárias distribuídas difusamente no estroma e concentradas nas zonas criptas e zonas sub-epiteliais do endométrio.

- estágio III (endometrite aguda): há um processo inflamatório, com predomínio de células polimorfonucleares na região das criptas e eventual migração para as camadas profundas do endométrio nos casos mais avançados. Pode-se ter um processo inflamatório no miométrio em alguns casos.

- estágio IV (endometrite crônica): as alterações variam de acordo com a patência da cérvix. Nos casos em que a cérvix se encontra aberta, há uma hipertrofia miometrial e fibrose, enquanto o endométrio apresenta atrofia, com fibrose no estroma, infiltração de linfócitos e raras células plasmocitárias. Quando a cérvix se encontra fechada, há uma significativa atrofia do endométrio, apresentando uma metaplasia escamosa.

Em 2001, De Bosschere et al. apresentou uma classificação mais detalhada, na qual o Complexo Hiperplasia Endometrial Cística foi dividido em dois grupos: HEC-mucometra (evidenciada em cadelas clinicamente saudáveis) e endometrite-piometra (evidenciada em cadelas com sintomatologia clínica). O processo inflamatório presente na endometrite-piometra é o que diferencia esses dois grupos. Isto posto, a HEC-mucometra pode ser classificada em HEC moderada, HEC grave e mucometra. Já a endometrite-piometra pode ser classificada com endometrite, piometra hiperplasia e piometra atrófica. Histologicamente são observados:

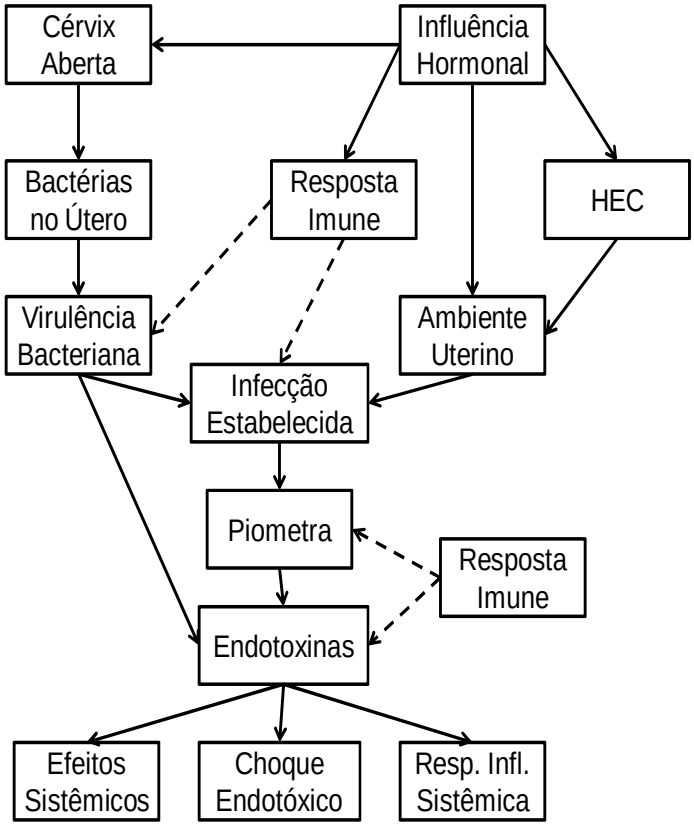
- HEC-mucometra: hiperplasia e hipertrofia das glândulas endometriais, congestão vascular, variação dos cistos, edema estromal e pequenos focos de hemorragia.
- Endometrite: endométrio com numerosos neutrófilos, linfócitos e células plasmocitárias. Presença de proliferação de fibroblastos no estroma e edema.
- Piometra Hiperplásica: presença de infiltrado inflamatório grave, onde se evidencia grande quantidade de neutrófilos, linfócitos e células plasmocitárias no estroma epitelial, no lúmen uterino e nas glândulas endometriais.
- Piometra Atrófica: há presença de atrofia do endométrio com pouca evidência de cistos, glândulas e estroma. Enquanto no miométrio pode ser observado uma hiperplasia.

Dentre as raças predispostas à piometra, encontram-se o Golden Retriever, Labrador Retriever, Pastor Alemão, Collie, Rottweiler (NISKANEN; THRUSFIELD, 1998; HAGMAN, 2012). Os fatores de risco da piometra são: idade do primeiro cio, duração e intervalos entre os períodos de cio, pseudociese, infecções prévias do trato urinário, neoplasias mamárias e hormonioterapia.

Há muitos anos, vários autores tentam esclarecer como os mecanismos desencadeadores do Complexo HEC-piometra interagem resultando na doença. Em

2004, Hagman et al. desenvolveu uma representação esquemática da fisiopatologia do Complexo HEC-piometra (Figura 1).

Figura 1 - Modelo esquemático dos fatores envolvidos na patogênese do Complexo HEC-piometra



Fonte: (adaptado de HAGMAN, 2004).

Há uma interação entre a progesterona e o estrógeno no desenvolvimento da piometra, mas a progressão e a gravidade da enfermidade dependem da migração de bactérias pelo canal uterino (DOW, 1959). As exposições sucessivas do endométrio à estimulação estrogênica em cada ciclo estral, seguido de uma prolongada estimulação progestacional durante o diestro, são responsáveis pelas alterações morfológicas que tornam o útero mais suscetível à ação bacteriana (NISKANEN; TRUSFIELD, 1998; JHONSTON et al., 2001; PRETZER, 2008).

O estrógeno, que está abundante no proestro e no estro, promove edema, aumento da vascularização e dos receptores de progesterona no endométrio,

migração de leucócitos para o lúmen uterino, dilatação e relaxamento da cérvix, o que permite a entrada de bactérias da flora normal vaginal para dentro da luz uterina (NELSON; COUTO, 2006). Já a progesterona, que está em grande quantidade no diestro, se liga aos seus receptores situados no endométrio, promovendo o aumento da quantidade e atividade das glândulas endometriais. Como resposta, há uma secreção maior de fluidos, inicialmente estéril, mas a sua composição com nutrientes torna o crescimento bacteriano favorável. Além disso, a progesterona tem um efeito supressor na imunidade celular, pois impede a migração leucocitária para o lúmen uterino (SUGIURA, *et al 2004*).

Segundo Johnston (2001), as bactérias da flora normal vaginal são as principais fontes de contaminação uterina, uma vez que elas conseguem penetrar no útero quando ocorre o relaxamento da cérvix. Mas a grande maioria dos autores relata que a bactéria mais comumente encontrada em cultivos de secreção uterina é a *Escherichia coli* (DOW, 1958; BIGLIARDI et al., 2004; WEISS et al., 2004; COGGAN et al., 2008). Bactéria gram-negativa, ela possui uma grande afinidade pelas células do endométrio e miométrio, fixando-se de maneira estável na parede uterina (HAGMAN et al., 2006). Quando destruída, ela libera uma endotoxina que é rica em lipopolissacarídeo (LPS), quimicamente estável e biologicamente ativa, causando lesão endometrial e sintomatologia clínica. Embora a infecção bacteriana não seja o fator desencadeante da piometra, ela é a responsável pela maioria dos casos de morbidade e mortalidade (RIETSCHEL et al., 1983; DABROWSKI et al., 2009).

As manifestações clínicas da piometra estão na dependência de alguns fatores, como: tempo de evolução do processo, grau de lesão uterina e eficiência da cérvix em permitir a drenagem do fluido purulento. Cadelas com piometra de cérvix aberta apresentam secreção vaginal de coloração amarelada (mucopurulenta) e avermelhada (sanguínea), sendo observado um menor comprometimento do estado geral. Em cadelas com piometra fechada, não há evidências de secreção vaginal, levando a uma distensão abdominal proporcional ao tamanho do útero (DOW, 1958; NELSON; COUTO, 2006; PRETZER, 2008).

Nas duas apresentações da piometra há a liberação de endotoxinas na cirtculação, promovendo assim alterações sistêmicas, como: letargia, inapetência, diarreia, vômito, depressão, poliúria e polidipsia. Tais sinais são mais graves em cadelas com piometra fechada, pois o diagnóstico do processo é estabelecido mais

tardiamente, não havendo a presença de um sinal fácil e precocemente identificado. Muitas vezes, o animal apresenta a Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS), podendo haver desidratação, hipotensão, hipotermia, toxemia e choque (FELDMAN, 2004; HAGMAN, 2012). Além disso, a esplenomegalia pode estar presente em decorrência de hematopoiese extramedular esplênica (FERREIRA et al., 2007). Segundo Dow (1957), o grau da dilatação do útero é inversamente proporcional ao grau de patência da cérvix.

Aliadas as alterações clínicas, podem ser observadas alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas, dependendo do estado evolutivo do processo e das condições clínicas do animal.

No exame bioquímico, alterações como: hiperproteinemia, hiperglobulinemia, bilirrubinemia, hipoalbuminemia, aumento da enzima aspartato amino transferase (AST) e fosfatase alcalina (FA). Tais alterações podem ocorrer devido a danos hepatocelulares causado pelo quadro de septicemia ou diminuição da circulação hepática secundária à hipóxia celular nos casos de desidratação (FELDMAN, 2004). A estimulação crônica do sistema imunológico pode levar a azotemia pré-renal, fazendo com que imuno-complexos precipitem nos glomérulos e túbulos alterando a resposta tubular renal ao hormônio antidiurético (ADH). Essas alterações renais podem ser reversíveis quando se tem resolução da piometra (NELSON; COUTO, 2006).

Em um estudo utilizando 17 cadelas com piometra aberta, Barros et al (2005) concluíram que as alterações encontradas no hemograma são características de um processo inflamatório, com grande estimulação antigênica.

Segundo Feldman (2004) e Thrall (2007), o hemograma é um exame significativo para cadelas com piometra, observando-se anemia normocítica normocrômica não regenerativa de grau leve a moderada. Tal alteração ocorre devido a um efeito supressor das toxinas bacterianas na medula óssea, e também pela migração das hemácias para o local de infecção por diapedese. Emanuelli (2007) relatou uma diminuição significativa nas mensurações de hematócrito, eritrócitos e hemoglobina em um estudo com 12 cadelas acometidas por piometra.

A anemia pode estar associada à cronicidade da doença, diminuição da eritropoiese devido ao efeito toxêmico sobre a medula óssea, diminuição da disponibilidade do ferro ou perda de sangue para o útero (HAGMAN, 2012).

Em um estudo com 292 animais, Morley et al. (2008) observaram que cães anêmicos com doenças infecciosas têm maior risco de desenvolver anticorpos anti-eritrocitários, constituindo-se na segunda maior causa de anemia hemolítica imunomediada logo depois das causas idiopáticas ou primárias. Segundo Thrall (2007) o metabolismo oxidativo dos neutrófilos leva a um aumento no consumo de oxigênio, gerando substâncias altamente oxidantes. Esses produtos gerados são de extrema importância para a função bactericida dos neutrófilos e destruição do tecido inflamatório. Embora esses metabólitos sejam necessários para o mecanismo de defesa do organismo, a formação de radicais livres pode modificar a estrutura antigênica da membrana do eritrócito, permitindo assim, a ligação de imunoglobulinas, e por fim ocasionando a destruição eritrocitária. Esses metabólitos são considerados potenciais fatores na destruição de eritrócitos nas anemias das doenças inflamatórias, embora Emanuelli (2007) tenha concluído que apesar da ocorrência do estresse oxidativo sistêmico, não há interferência no sistema redox intraeritrocitário, não havendo, portanto, maior suscetibilidade a lise.

Em relação ao leucograma, é observada leucocitose caracterizada por neutrofilia com ou sem desvio à esquerda, acompanhado ou não de monocitose, dependendo da cronicidade e gravidade da infecção. Evidências de granulações tóxicas em neutrófilos também podem ocorrer (FELDMAN, 2004). Segundo Bartoskova et al. (2007), há uma redução do número total de leucócitos após a ovariosalpingohisterectomia (OSH).

2.2 A ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) é uma doença caracterizada pela destruição precoce das hemácias decorrente da fixação de imunoglobulinas na membrana eritrocitária que leva a diminuição do número dos eritrócitos circulantes, devido à hemólise intravascular ou extravascular. É um dos tipos mais comuns de anemia em pequenos animais, e é a alteração imunohematológica mais comum nos cães (BARKER et al., 1992; BORDIN et al., 1991; QUICLEY et al., 2001; THRALL et al., 2007). Ela pode ocorrer como um evento primário ou secundário a uma grande variedade de doenças infecciosas ou neoplásicas (BARKER, 2000).

Segundo Tizard (2002), por volta de um terço dos casos de AHIM primária se associa a outras alterações imunológicas, e seu início pode estar correlacionado com alterações hormonais, como na piometra. Já a AHIM secundária é causada por uma resposta imunológica contra antígenos não próprios que modificam ou se associam a membrana eritrocitária normal (QUICLEY et al., 2001).

Considerada como uma reação de hipersensibilidade do tipo II, a AHIM envolve anticorpos anti-eritrocitários que atacam direta ou indiretamente vários componentes da membrana eritrocitária (BALCH, 2007). Como descrito por Day e Mackin (2008), os mecanismos que podem levar a esses anticorpos se ligarem na membrana eritrocitária são:

- os auto-anticorpos se direcionam a epítopos da membrana eritrocitária;
- aloticorpos ligam-se a aloantígenos;
- os anticorpos se direcionam contra epítopos exógenos aderidos à membrana eritrocitária;
- alguns medicamentos podem aderir a uma molécula da membrana eritrocitária, formando um novo epítopo, o qual será reconhecido como estranho;
- um processo de mimetismo molecular pode ocorrer entre os antígenos do hospedeiro e do agente, causando uma reação imunológica cruzada;

Alguns animais têm uma regulagem deficiente das funções supressoras dos linfócitos T ou têm uma superestimulação do sistema imune. Isto faz com que haja a formação de auto-anticorpos contra antígenos da membrana eritrocitária do próprio animal (BARKER, 2000).

Segundo Tizard (2008), a AHIM é dividida em cinco classes. Essa classificação, que pode ser visualizada na Figura 2, leva em conta o tipo de anticorpo envolvido, a temperatura ideal para reação dos anticorpos e a natureza do processo hemolítico.

Quadro 1 - Classificação das AHIM

Classes	Anticorpo Predominante	Atividade	Temp. Ideal (ºC)	Sítio de Remoção dos Eritrócitos	Efeito Clínico
I	IgG e IgM	Aglutinina	37	Baço	Aglutinação Intravascular
II	IgM	Hemolisina	37	Fígado	Hemólise Intravascular
III	IgG	Incompleta	37	Baço	Anemia
IV	IgM	Aglutinina	4	Fígado	Cianose em Extremidades
V	IgM	Incompleta	4	Fígado	Anemia

Fonte: (TIZARD, 2008)

2.2.1 As principais imunoglobulinas envolvidas na AHIM

As principais imunoglobulinas envolvidas na AHIM são a Imunolgobulina G (IgG), a Imunoglobulina M (IgM) e a Imunoglobulina A (IgA). Elas se diferem entre si na estrutura das cadeias pesadas, sendo que as cadeias leves são iguais para todas as classes de imunoglobulinas (TIZARD, 2002).

A IgG é produzida e secretada pelos plasmócitos encontrados no baço, medula óssea e linfonodos. É a imunoglobulina mais abundante no sangue, exercendo um papel principal nos mecanismos de defesa mediados por anticorpos. A IgM tem a mesma origem de produção e secreção que a IgG, e é a segunda maior concentração de imunoglobulina no sangue. É mais eficiente que a IgG na ativação do sistema complemento, opsonização, neutralização de vírus e aglutinação (TIZARD, 2002).

A IgA tem sua produção também pelos plasmócitos encontrados nos tratos intestinal, respiratório, urinário, pele e glândula mamária. Ao contrário da IgM, a IgA não tem a capacidade de ativar o sistema complemento, mas é capaz de impedir a aderência de antígenos às superfícies corpóreas (TIZARD, 2002).

Todos os eritrócitos possuem uma pequena quantidade de IgG em sua superfície, podendo estar associada à remoção destes da circulação. A citometria de

fluxo é um método excelente para detecção destas pequenas quantidades de imunoglobulinas na superfície de eritrócitos (QUIGLEY et al., 2001; MORLEY et al, 2008).

2.2.2 A detecção de imunoglobulinas por citometria de fluxo.

A citometria de fluxo é uma avançada tecnologia que permite avaliar simultaneamente diversos parâmetros de partículas, geralmente células. As células devem estar suspensas em meio líquido, que ao passar por um ou mais feixes de luz incidentes (lasers) geram informações relativas ao tamanho, granulosidade, complexidade interna e às intensidades de fluorescências de cada célula. Este teste tem como finalidade a análise celular de maneira rápida, multiparamétrica e quantitativa (QUIGLEY et al., 2001).

Segundo Morley et al. (2008), em um estudo prospectivo com 292 cães, a utilização da citometria de fluxo para a detecção de imunoglobulinas na superfície de eritrócitos foi de alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de AHIM.

3 HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é de que em cadelas acometidas por piometra pode ocorrer anemia decorrente da destruição precoce de eritrócitos pela presença de imunoglobulinas em sua superfície.

4 OBJETIVO

Identificar e quantificar os eritrócitos com imunoglobulinas em sua superfície em cadelas com piometra.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo em questão atendeu aos requisitos elencados pela Comissão de Ética no uso de animais de acordo com os princípios éticos na experimentação animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo, recebendo o protocolo nº 3062/2013.

5.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram incluídas no estudo 33 cadelas atendidas no Serviço de Obstetrícia / Ginecologia do Hospital Veterinário (HOVET) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo, e nas quais foi estabelecido o diagnóstico de piometra mediante o histórico, avaliação física e exames subsidiários (ultrassonografia, hemograma e dosagens de ureia e creatinina séricas) pelos Médicos Veterinários e Residentes em atividade no referido serviço, para compor o Grupo denominado Piometra. As amostras foram coletadas entre Janeiro de 2014 à Setembro de 2014.

Dos cães com piometra, foram coletadas amostras de sangue no momento Zero (pré-operatório) e entre o 7º e 10º dia após a ovariosalpingohisterectomia (OSH).

Para compor o Grupo Controle, foram selecionadas 30 cadelas hígidas provenientes da cidade de São Paulo, de faixa etária variável, próxima a das cadelas do Grupo Piometra. As amostras deste grupo foram coletadas no período de Setembro de 2014 à Janeiro de 2015.

A utilização dos animais na pesquisa foi previamente autorizada pelos respectivos proprietários conforme o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido disponibilizado (Anexo A).

5.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS

As amostras sanguíneas foram coletadas por punção da veia jugular, cefálica ou femoral, e acondicionadas em frasco contendo anticoagulante EDTA – K_2 (Vacutainer® Becton Dickinson, USA) para a realização do hemograma, contagem de reticulócitos e detecção de IgG e IgM na superfície de eritrócitos, e em frasco contendo gel ativador de coagulação (Vacutainer® SST, Becton Dickison, USA) para a realização de ureia, creatinina, proteínas séricas totais e albumina.

Todos os exames laboratoriais foram realizados no Laboratório Veterinário de Análises Clínicas do Hospital Veterinário / Departamento de Clínica Médica - VCM, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo.

5.3 HEMOGRAMA

A determinação do hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, e determinação dos índices hematimétricos, foram realizadas em analisador automático hematológico (ADVIA 2120i Hematology System, Siemens®, USA).

A contagem diferencial dos leucócitos e as avaliações morfológicas dos elementos sanguíneos foram realizadas a partir da confecção de um esfregaço sanguíneo e corado pelo método de Rosenfeld (BIRGEL, 1982).

A determinação do número de reticulócitos foi realizada a partir da incubação à temperatura de 37ºC por 15 minutos, de uma mistura de quantidades iguais de sangue total com EDTA e do corante Azul de Cresil Brilhante (Laborclin®, Brasil). Após este procedimento, foi confeccionado uma extensão sanguínea com esta mistura, e contra-corada, posteriormente, pelo método de Rosenfeld. Os valores relativos dos reticulócitos foram obtidos pela contagem desses elementos em 1.000 eritrócitos, sendo o resultado expresso em %.

5.4 BIOQUÍMICA SÉRICA

As determinações séricas de ureia, creatinina, proteínas séricas totais e albumina, foram realizadas em analisador bioquímico automático (Labmax 240®, Labtest Diagnóstica SA) por reações de química úmida.

5.5 DETERMINAÇÃO DE IGG E IGM NA SUPERFÍCIE DOS ERITRÓCITOS

A detecção de imunoglobulinas (IgG e IgM) na superfície do eritrócitos foi realizada utilizando-se citometria de fluxo. A metodologia empregada foi aplicada conforme Quigley et al. (2001) e Passarelli (2011).

Foram utilizados anticorpos anti-IgG de cão produzido em ovelha (A40-118F-13 / Bethyl® Laboratories Inc., USA) e anti-IgM produzido em cabra (A40-116F-20 / Bethyl® Laboratories Inc., USA). Ambos os anticorpos foram previamente titulados e conjugados com fluoresceína de isotiocianato (FITC).

5.5.1 Preparo das amostras para citometria de fluxo

As amostras sanguíneas para citometria de fluxo foram inicialmente submetidas à força de centrifugação de 150 g, por cinco minutos, removendo-se a seguir o plasma e a camada leucocitária; as hemácias foram lavadas três vezes, adicionando-se ao sedimento 5 mL de NaCl 0,9%, a mistura homogeneizada e centrifugada e o sobrenadante desprezado. Ao final da lavagem, o sobrenadante foi removido e 0,02 mL da papa de hemácias foi ressuspensa, completando-se o volume com 0, 98 mL de NaCl 0,9%. As hemácias foram marcadas com anticorpos IgG e IgM, incubando-se em tubos para citometria 0,1 mL da suspensão de eritrócitos e 0,001 mL de anticorpos anti-IgG e anti-IgM, respectivamente, em reações separadas, protegidos da luze e em temperatura ambiente. Após o término da incubação, cada um dos tubos foi acrescido de 2 mL de solução de NaCl 0,9%,

homogeneizado e centrifugado novamente a 150g durante um minuto, o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspenso em 0,5 mL de NaCl 0,9%.

A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company© 2007 BD).

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Realizou-se análise estatística descritiva, utilizando medidas como: média, mediana, mínimo, máximo, 1º quartil e 3º quartil. Diagramas de caixas (Box *plot*) foram construídos para expor as variações das amostras coletadas.

Inicialmente os dados foram submetidos à análise de normalidade da distribuição dos dados pelo Teste de Shapiro-Wilk ($P \geq 0,05$). Para as variáveis com distribuição normal, foram utilizados o Teste t ou Teste t pareado e Correlação de Pearson. As variáveis que não seguiram a distribuição normal foram analisadas pelo Teste U de Mann-Whitney e Correlação de Spearman.

6 RESULTADOS

A idade média dos cães com piometra foi de 9,8 anos, sendo o intervalo de variação de 5 a 16 anos. Os cães que formaram o Grupo Controle também se encontravam na faixa etária semelhante com média de 8,8 anos e intervalo de variação de 6 a 12 anos.

Na tabela 1, observa-se a distribuição dos cães do Grupo Controle e do Grupo Piometra de acordo com a definição racial.

Tabela 1 - Distribuição dos cães do grupo controle e de cães com piometra, de acordo com a definição racial. São Paulo - 2014–2015

Raças	Grupo Controle (n)	Grupo Piometra (n)
Border Collie	0	2
Boxer	1	0
Cocker Spaniel	0	1
Dogue Alemão	0	1
Labrador	2	2
Lhasa Apso	0	1
Pinscher	4	3
Pit-Bull	0	3
Poodle	0	1
Poodle Médio	5	2
Poodle Toy	0	2
Rottweiller	1	2
Sem raça definida (SRD)	16	12
Yorkishire	1	1
Total	30	33

Nas tabelas 2, 3 e 4 são apresentados os valores médios, mediana, valores mínimos e máximos, primeiro quartil e terceiro quartil, e desvio padrão da média dos valores hematológicos do grupo controle e dos cães com piometra no momento pré-operatório e pós-operatório, respectivamente.

Tabela 2 - Valores médios, mediana, mínimo e máximo, primeiro quartil e terceiro quartil, e desvio padrão da média das variáveis hematológicas dos cães do Grupo Controle. São Paulo - 2014–2015

Variável	Média (Mediana)	Mínimo – Máximo	1º Quartil	3º Quartil	Desvio Padrão
Idade (anos)	8,8 (9)	6 – 12	7,3	10	1,7
Ht (%)	47,9 (47)	40 – 57	45,3	50	4,7
Hb (g/dl)	15,5 (14,9)	12,8 - 19,4	14,4	16,2	1,6
He ($x10^6$/µl)	6,7 (6,6)	5,8 - 8,1	6,1	7,4	0,7
VCM (fL)	71,1 (70,7)	66,7 – 77	69	73,1	2,8
HCM (pg)	23 (22,8)	21 – 26	22,2	23,7	1,1
CHCM (%)	32,3 (32,2)	31 - 34,6	31,5	33,2	1,0
Leucócitos ($x10^3$/µl)	10 (9,5)	6,4 – 15	8,4	11.5	2,6
Plaquetas ($x10^3$/µl)	371,9 (379)	204 – 598	292,8	454,2	114

Tabela 3 - Valores médios, mediana, mínimo e máximo, primeiro quartil e terceiro quartil, e desvio padrão da média das variáveis hematológicas dos cães do Grupo Piometra no momento pré- operatório. São Paulo - 2014

Variável	Média (Mediana)	Mínimo – Máximo	1º Quartil	3º Quartil	Desvio Padrão
Idade (anos)	9,8 (10)	5 – 16	8	12	2,83
Ht (%)	33,2 (34)	13 – 38	13	47	7,15
Hb (g/dl)	11,5 (11,7)	4,5 - 16,9	10,2	13	2,61
He ($x10^6$/µl)	5,3 (5,4)	2,1 - 7,9	4,7	5,9	1,22
VCM (fL)	63,6 (64)	57,9 – 67	62	65,1	2,18
HCM (pg)	22.1 (22)	20 – 25	21	23	1,2
CHCM (%)	34,6 (35)	32 - 38,3	33,7	35,2	1,42
Reticulócitos ($x10^3$/µl)	25,8 (13,5)	4,2 – 140,1	60,1	100,4	29,8
Leucócitos ($x10^3$/µl)	29,6 (30,2)	3,4 - 77,3	14,5	39,6	19,2
Plaquetas ($x10^3$/µl)	216,3 (205)	49 – 1.270	415	729	216

Tabela 4 - Valores médios, mediana, mínimo e máximo, primeiro quartil e terceiro quartil, e desvio padrão da média das variáveis hematológicas dos cães do Grupo Piometra no momento pós-operatório. São Paulo - 2014

Variável	Média (Mediana)	Mínimo – Máximo	1º Quartil	3º Quartil	Desvio Padrão
Ht (%)	32 (34)	16 – 45	25	39	8,31
Hb (g/dl)	10,6 (10,9)	5,2 - 15,6	8,3	12,6	2,87
He ($x10^6$/µl)	4,8 (4,9)	2,5 - 7,5	3,8	5,7	1,31
VCM (fL)	66,8 (66,6)	58,5 - 74,1	64,3	70,2	4,1
HCM (pg)	22 (22,1)	19,2 – 24	21,2	22,8	1,06
CHCM (%)	33 (33,1)	30,7 - 35,1	32,3	35,1	1,05
Reticulócitos ($x10^3$/µl)	135,6 (91,5)	7,6 – 457,8	143,6	310,1	116,7
Leucócitos ($x10^3$/µl)	17,9 (14,7)	3,8 - 64,6	10,1	19,4	13,63
Plaquetas ($x10^3$/µl)	676,8 (644)	71 - 1.257	468	839	281,36

Foram construídos diagramas de caixas (Box *plot*) para expor as variações das variáveis hematócrito e número de hemácias, dos Grupos Controle e Piometra nos momentos pré-operatório e pós-operatório. As variações podem ser observadas nas Figuras 2 e 3.

Figura 2 - Diagrama de caixas (Box *plot*) representando as variações dos valores do hematócrito dos Grupos Controle e Piometra nos momentos pré-operatório e pós-operatório. São Paulo - 2014–2015

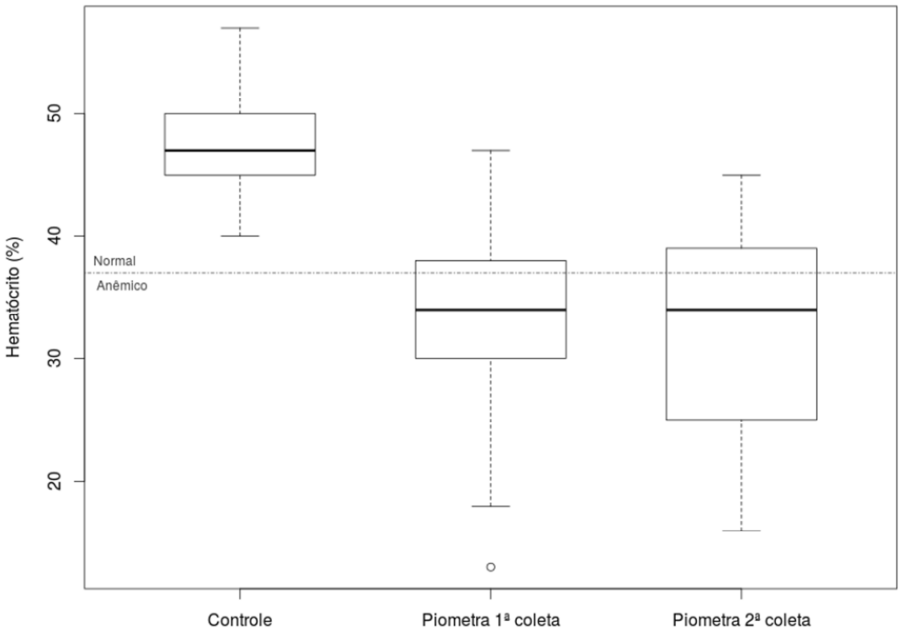
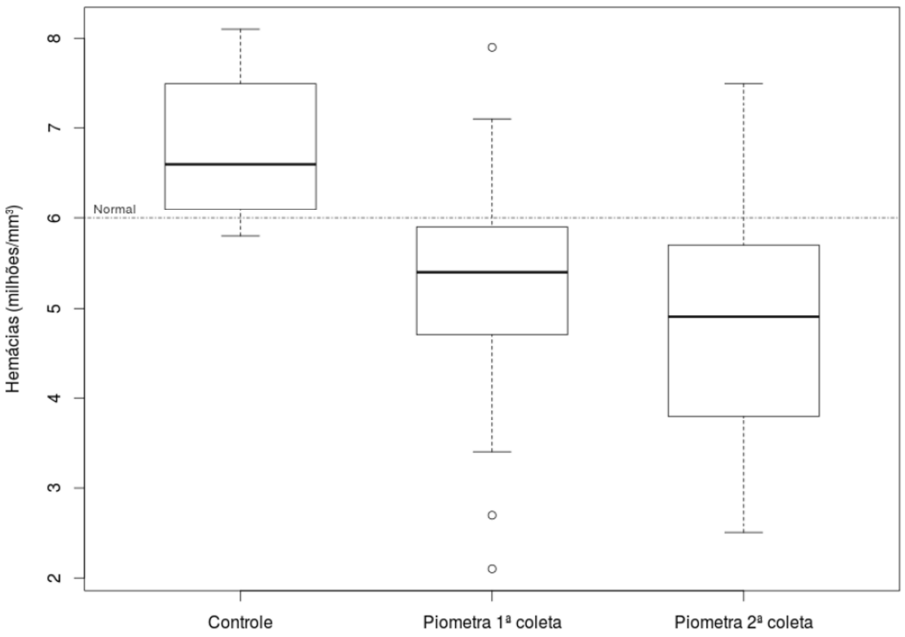


Figura 3 - Diagrama de caixas (Box *plot*) representando as variações do número total de hemácias dos Grupos Controle e Piometra nos momentos pré-operatório e pós-operatório. São Paulo - 2014–2015



As tabelas 5 e 6 representam os valores individuais, média, mediana, valores mínimo e máximo, desvio padrão da média do percentual de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC e anti-IgM FITC, analisadas por citometria de fluxo dos Grupos Controle e Grupo Piometra no momento pré-operatório e pós-operatório, respectivamente.

Tabela 5 - Valores individuais, média, mediana, valores mínimo e máximo, primeiro e terceiro quartis e desvio padrão da média do percentual de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC e anti-IgM FITC dos cães pertencentes ao Grupo Controle. São Paulo - 2014–2015

Número	Protocolo	Anti-IgG FITC (%)	Anti-IgM FITC (%)
1	242.063	0.14	0.56
2	242.500	0.72	0.73
3	242.501	0.42	0.62
4	242.502	0.77	0.83
5	242.637	0.33	0.35
6	242.639	0.57	1.31
7	242.640	0.37	0.63
8	242.799	0.19	0.34
9	242.800	0.23	0.45
10	242.802	0.29	0.42
11	242.803	0.42	0.62
12	242.863	0.41	0.51
13	242.864	0.55	0.7
14	242.865	0.33	0.91
15	242.866	0.31	0.58
16	243.796	0.44	0.9
17	243.797	0.44	0.51
18	243.798	0.2	0.4
19	243.799	0.69	0.9
20	243.800	0.77	1.19
21	243.987	0.69	1.34
22	243.988	0.61	1.1
23	243.989	0.61	0.91
24	243.990	0.45	0.93
25	243.991	0.35	0.52
26	244.069	0.29	0.53
27	244.070	0.28	0.32
28	244.123	0.24	0.33
29	244.222	0.51	0.67
30	244.223	0.21	0.35
	Média (Mediana)	0,43 (0,42)	0,68 (0,62)
	Mínimo - Máximo	0,14 - 0,77	0,32 - 1,34
	1º Quartil	0,29	0,47
	3º Quartil	0,57	0,9
	Desvio Padrão	0,18	0,29

Tabela 6 - Valores individuais, média, mediana, valores mínimo e máximo, primeiro e terceiro quartis e desvio padrão da média do percentual de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC e anti-IgM FITC dos cães pertencentes ao Grupo Piometra nos momentos pré-operatório e pós-operatório. São Paulo - 2014

		Pré-Operatório		**Pós-Operatório**	
Número	**Protocolo**	**Anti-IgG FITC (%)**	**Anti-IgM FITC (%)**	**Anti-IgG FITC (%)**	**Anti-IgM FITC (%)**
1	236.988	1.27	1.42	1.18	1.3
2	237.029 (044)	1.18	1.3	1.84	1.89
3	237.173	4.19	9.58	1.21	3.27
4	237.197	1.03	1.24	1.15	1.3
5	237.201	0.49	0.61	1.24	1.31
6	237.060	0.21	0.35	0.22	0.32
7	237.367	0.51	0.29	5	7
8	237.362	0.26	0.37	0.21	0.31
9	224.903	0.25	0.34	0.67	0.52
10	237.451	0.42	0.47	1.33	2.07
11	217.488	0.45	0.52	1.01	1.05
12	237.620	0.96	1.12	7.53	11.26
13	237.700	1.77	3.16	1.42	2.83
14	237.912	0.72	1.46	2	2.02
15	237.958	0.21	0.44	2.1	1.38
16	207.302 (238.021)	0.57	0.48	0.18	0.15
17	238.255	0.86	1.71	1.03	1.63
18	238.272	1.19	1.75	0.3	0.39
19	238.276	2.15	3.17	3.49	10.14
20	238.424	0.29	0.31	2.31	1.66
21	239.997	0.52	0.97	2.15	3.22
22	239.979	1.81	0.89	1.27	1.13
23	240.393	1.99	1.08	14.82	12.67
24	240.415	0.49	0.53	2.54	4.6
25	240.510	0.62	1.02	3.42	8.27
26	240.599	0.65	1.32	3.23	7.67
27	240.662	1.97	1.8	5.45	7.85
28	240.864	0.19	0.35	0.98	3.4
29	241.914	0.14	0.4	0.85	0.81
30	241.505	0.65	0.99	2.35	5.83
31	236.131	2.38	3.52	16.24	19.76
32	179.144	0.38	0.3	0.35	0.27
33	241.985	1.04	1.93	2.23	4.97
	Média (Mediana)	0,96 (0,65)	1,37 (0,99)	2,77 (1,42)	4,01 (2,02)
	Mínimo - Máximo	0,14 - 4,19	0,29 - 9,58	0,18 - 16,2	0,15 - 19,8
	1º Quartil	0,42	0,44	1,01	1,13
	3º Quartil	1,19	1,46	2,54	5,83
	Desvio Padrão	0,86	1,71	3,67	4,46

Foram construídos diagramas de caixas (Box *plot*) para expor as variações das variáveis: anticorpos anti-IgG FITC e anti-IgM FITC, dos Grupos Controle e Piometra nos momentos pré e pós-operatório. As variações podem ser observadas nas Figuras 4 e 5.

Figura 4 - Diagrama de caixas (Box *plot*) da porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC dos Grupos Controle e Piometra nos momentos pré-operatório e pós-operatório. São Paulo - 2014–2015

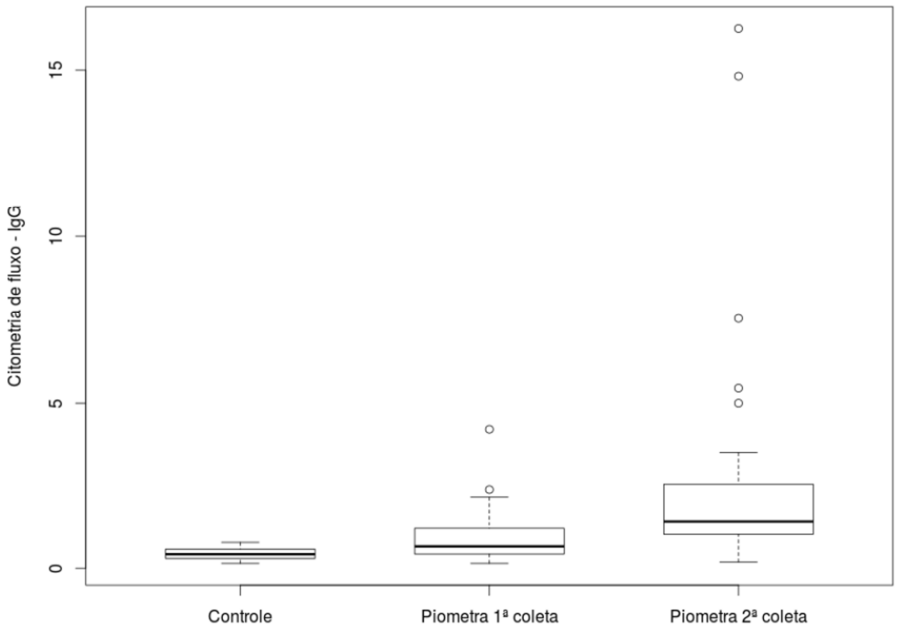
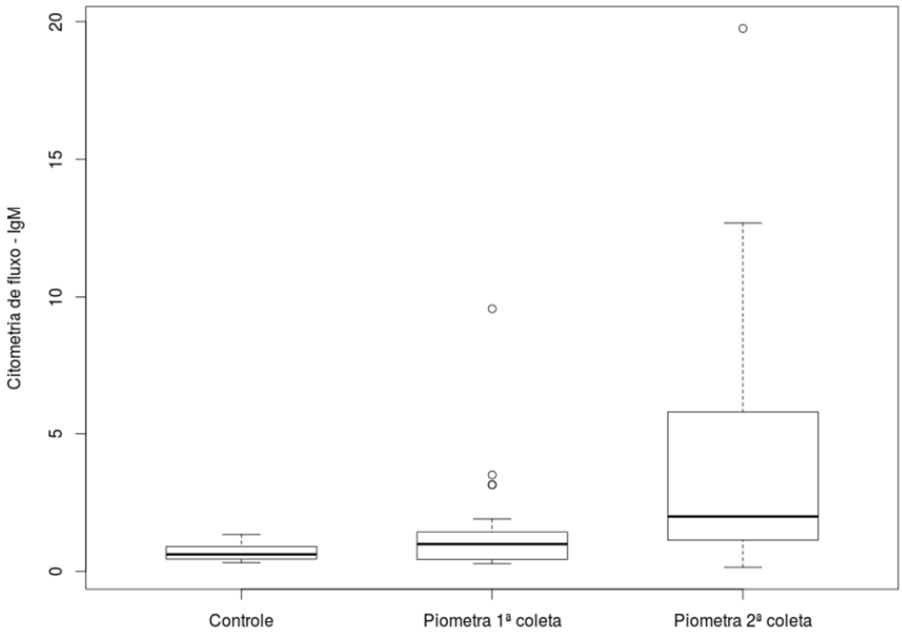


Figura 5 - Diagrama de caixas (Box *plot*) da porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgM FITC dos Grupos Controle e Piometra nos momentos pré-operatório e pós-operatório. São Paulo - 2014–2015



Quando se comparou o percentual de hemácias para anticorpos anti-IgG FITC em sua superfície, observou-se que enquanto o Grupo Controle apresentou 0,43% de hemácias marcadas, os animais pertencentes ao Grupo Piometra foram observadas 0,96% (p = < 0,001) e 2,77% (p = < 0,001), nos momentos pré e pós-operatório, respectivamente. Em relação à marcação para anticorpos anti-IgM, foi observado 0,68% de hemácias marcadas no Grupo Controle, e 1,37% (p = 0,09) e 4,01% (p = < 0,001) nos cães pertencentes ao Grupo Piometra, nos momentos pré e pós-operatório.

Apenas um animal (3,03%) da primeira coleta do Grupo Piometra apresentou marcação de hemácias para anticorpos anti-IgM FITC acima de 5%. Já na segunda coleta, nove animais (22,7%) apresentaram marcações acima de 5% para anticorpos anti-IgG FITC e anti-IgM. Essas marcações variaram entre 5% e 19,76%.

Os animais do Grupo Piometra que apresentaram marcação anti-IgG e anti-IgM superior a 5%, tiveram uma diminuição do valor do hematócrito de até 15% entre a primeira e segunda coleta. Porém, os animais deste mesmo grupo que

apresentaram marcações inferiores a 5% de anti-IgG e anti-IgM, tiveram uma diminuição de até 12% do valor do hematócrito entre a primeira e segunda coleta.

As variáveis hematócrito, hemoglobina, hemácias e porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC e anti-IgM, foram testadas quanto a normalidade da distribuição dos dados pelo Teste de Shapiro-Wilk, considerando-se o valor de $p \geq 0,05$.

Nas figuras 6 e 7, observa-se o histograma de dispersão e os coeficientes de correlação entre as variáveis: hematócrito, hemoglobina, hemácias, IgG e IgM, do grupo Piometra nos momentos pré e pós-operatório respectivamente.

Figura 6 - Matriz de correlação do Grupo Piometra no momento pré-operatório. São Paulo - 2014

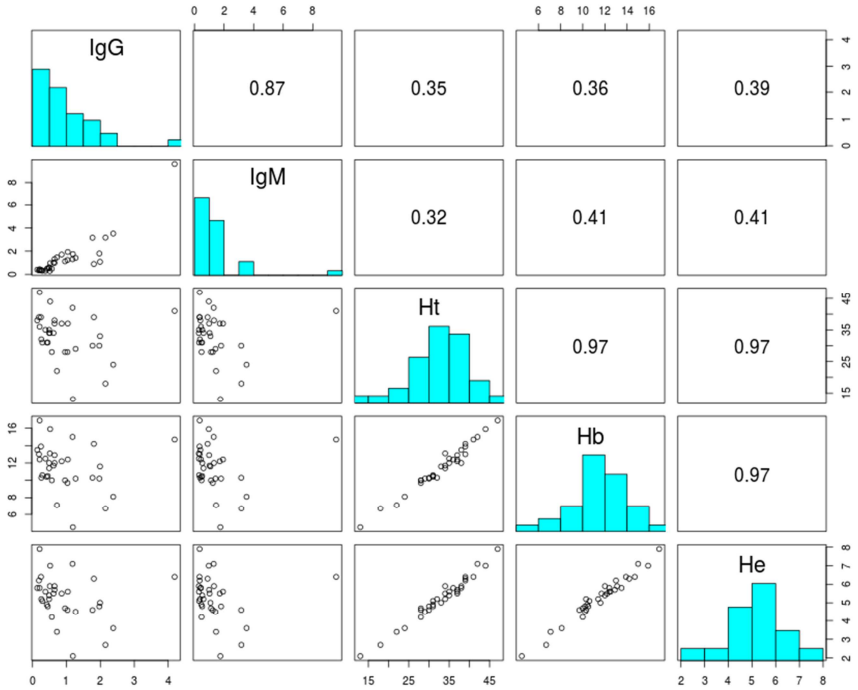
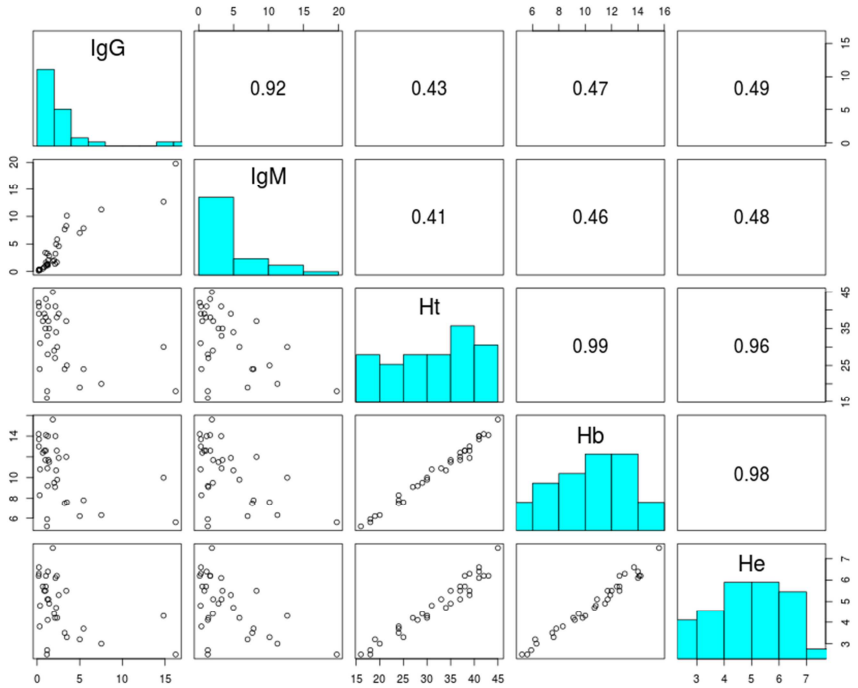


Figura 7 -Matriz de correlação do Grupo Piometra no momento pós-operatório. São Paulo - 2014



7 DISCUSSÃO

A anemia é uma das alterações clínica patológicas mais frequentemente associada à piometra (FELDMAN, 2004; EMANUELLI, 2007; THRALL, 2007; EVANGELISTA, 2009). Corroborando essa hipótese, o valor médio das variáveis do eritrograma dos 33 animais com piometra incluídos neste estudo situava-se aquém da média abaixo da qual se considera que o animal está anêmico. Analisando os valores hematológicos de cada um dos cães incluídos no estudo, observa-se que 19 (57,6%) apresentavam anemia normocítica normocrômica não regenerativa no momento pré-operatório. Esse número reduz para cinco (15,2%) animais após a OSH.

Segundo Emanuelli (2007) e Hangman (2012), tal alteração ocorre devido a um efeito supressor das toxinas bacterianas na medula óssea, e também pela migração de hemácias para o local da infecção por diapedese. Na gênese da anemia dos processos inflamatórios crônicos, está a indisponibilização de ferro como mecanismo de defesa inespecífica do organismo (FRY, 2010). Sabe-se atualmente que nesses casos, há o incremento da produção de hepicidina pelos hepatócitos, intalando-se assim um estado de hipoferremia. Esse processo leva a um estado gradual de anemia com caráter não regenerativo (OATES, 2007; LEMOS, et al., 2010; FIGUEIREDO, 2010).

Entretanto, outros mecanismos poderiam se encontrar na gênese da anemia, como citam Morley et al. (2008) e Tizard (2008). De acordo com esses autores, a anemia hemolítica causada pelos processos infecciosos, pode se desenvolver como consequência da deposição de imunocomplexos na superfície das hemácias ou da produção de anticorpos anti-eritrocitários, o que resulta na destruição eritrocitária precoce.

A porcentagem de hemácias com imunoglobulinas na superfície pode ser determinada por Citometria de Fluxo (QUIGLEY et al., 2001; MORLEY et al., 2008). Segundo esses autores, a utilização da citometria para a detecção de imunoglobulinas na superfície de hemácias constitui-se em método de alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de AHIM. Morley et al. (2008) consideram marcações de hemácias maiores que 5% como indicativas de deposição de imunoglobulinas na superfície das hemácias além do valor fisiológico, uma vez

que a média mais dois desvios padrões dos resultados obtidos para cães sadios foi 5% para ambas as imunoglobulinas (IgG e IgM).

No presente estudo, a marcação encontrada em animais do Grupo Controle foi (mínimo - máximo): 0,14 – 0,77% para anticorpos anti-IgG e 0,32 – 1,34% para anticorpos anti-IgM. Segundo Quigley et al. (2001), essa marcação representa hemácias senescentes, que serão removidas da circulação fisiologicamente. Nos animais do grupo experimental, a marcação encontrada na primeira coleta foi (mínimo – máximo): 0,14 – 4,19% para anticorpos anti-IgG e 0,29 – 9,58% para anticorpos anti-IgM, revelando a existência de alguns cães em que a deposição de imunocomplexos é mais evidente do que em outros. A amplitude de variação foi ainda maior no momento pós-OSH onde foi encontrada a marcação de 0,18 – 16,2% para anticorpos anti-IgG e 0,15 – 19,8% para anticorpos anti-IgM. Essas variações de porcentagem também são relatadas por Wilkerson et al. (2000); Morley et al. (2008) e Passarelli (2011). A deposição de imunocomplexos pode estar relacionada ao uso prévio de corticoides, transfusão sanguínea ou doença infecciosa concomitante.

Neste estudo, não foi relatado pelos proprietários o uso prévio de corticoides nos animais de ambos os grupos nos momentos de coleta. E em apenas três animais do Grupo Piometra (207.302, 238.272 e 238.276) houve a necessidade de realizar transfusão sanguínea entre a primeira e segunda coleta.

A deposição de IgG ou de IgM na superfície das hemácias pode estar ligada a presença de toxinas bacterianas aderidas à membrana eritrocitária, resultando na ligação com imunoglobulinas específicas ou a formação de complexos antígeno-anticorpo na circulação sanguínea, ocasionando posteriormente a deposição destes na superfície das hemácias (MORLEY et al., 2008).

A estimulação crônica do sistema imune por excesso de antígeno de *Escherichia coli* do útero infectado pode induzir a formação de imunocomplexos circulantes, predispondo a precipitação no glomérulo, e consequente disfunção glomerular e tubular em cães (MADDENS et al., 2010). Da mesma forma, pode ocorrer a deposição na superfície das hemácias, justificando-se a maior frequência de hemácias marcadas com anti-IgG FITC no momento pré-cirúrgico. É possível que durante a intervenção cirúrgica, com a manipulação dos órgãos, tenha havido maior mobilização de toxinas (JOHNSON, 1991; JONAS et al., 1993), ou de substâncias antigênicas teciduais, resultando no aumento da deposição de imunocomplexos na

membrana eritrocitária, justificando assim, o aumento de hemácias marcadas no grupo Piometra (pós-operatório).

Entretanto, apesar das diferenças observadas no percentual de hemácias marcadas entre os animais do Grupo Controle e do Grupo Piometra, tanto antes quanto após a OSH, não houve exacerbação da anemia, como pode ser observado no estudo da correlação (Figuras 5 e 6) entre as variáveis hematológicas e a deposição de imunocomplexos.

Em relação ao desenvolvimento e agravamento da anemia, observado em alguns animais no momento da segunda coleta do Grupo Piometra (236.988, 237.197, 237.201, 237.958, 240.864, 179.144 e 241.985), pode estar relacionado em parte com a perda sanguínea ocorrida durante o ato cirúrgico. Nesses animais a deposição de imunocomplexos na superfície eritrocitária não excedeu a marcação limítrofe de 5%, não havendo, portanto, indicação de hemólise por deposição de imunocomplexos, nem perda sanguínea que tivesse resultado no aumento de reticulócitos.

O tempo necessário para a recuperação de um quadro hemorrágico agudo intenso, como por exemplo, uma cirurgia, é de aproximadamente duas semanas (BARKER, 2000). A recomendação específica nesses casos é a de que seja implementado um tratamento adequado para animais anêmicos que passaram por um procedimento cirúrgico, a fim de que o animal se recupere mais rapidamente. Segundo Evangelista (2009), cadelas com piometra devem receber tratamento para anemia no pré e no pós-operatório de OSH, com o objetivo de que a resposta medular ao estresse cirúrgico seja efetiva.

8 CONCLUSÃO

Nas condições deste experimento, conclui-se que a piometra está associada à deposição de imunoglobulinas G ou M na superfície das hemácias, sem, no entanto, promover hemólise ou agravamento da anemia.

REFERÊNCIAS

BLACH, A.; MACKIN, A. Canine immune-mediated hemolytic anemia: pathophysiology, clinical signs and diagnosis. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 29, n. 4, p. 217-225, 2007.

BARKER, R. N. Anemia associated with immune responses. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm´s veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 169-177.

BARKER, R. N.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; STOKES, C. R.; ELSON, C.J. Autoimmune haemolysis in the dog: Relationship between anaemia and the levels of red blood cell bound immunoglobulins and complement measured by an enzyme-linked antiglobulin test. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 34, n. 1-2, p. 1-20, 1992.

BARROS, N. U. M.; SILVA, U. R. C.; VILAR, T. D.; MORAES, G. J. A. Achados sanguíneos em cadelas com piometra aberta. **Revista da Universidade Rural**, Sér. Ci. Vida. Seropédica, Rio de Janeiro, v. 25, p. 143-144, 2005.

BARTOSKOVA, A.; ONDRACKOVA, L. L.; VITASEK, R.; NOVOTNY, R.; JANOSOVSKA, M.; FALDYNA, M. The effects of in vitro exposure to progesterone and estradiol-17β on the activity of canine neutrophils. **Veterinarni Medicina**, Czech Republic, v. 59, p. 202-209, 2014.

BIGLIARDI, E.; PARMIGIANI, E.; CAVIRANI, S.; LUPPI, A.; BONATI, L.; CORRADI, A. Ultrasonography and cystic hiperplasia-pyometra complex in the bitch. **Reprodution in Domestic Animals**, v. 39, n. 3, p. 136-140, 2004.

BIRGEL, E. H. Hematologia clínica Veterinária, In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1982, São Paulo. 1982. 50 p.

BORDIN, J. O.; SOUZA-PINTO, J. C.; KERBAUY, J. Measurement of red blood cell antibodies in autoimmune hemolytic anemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.21, n.9, p. 895-899, 1991.

COGGAN, J. A.; MELVILE, P. A.; OLIVEIRA, C. M.; FAUSTINO, M.; MORENO, A. M.; BENITES, N. R. Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 470-483, 2008.

COGGAN, J. A.; OLIVEIRA, C. M.; FAUSTINO, M.; MORENO, A. M.; VON SYDOW, A. C.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R. Estudo microbiológico de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra e pesquisa de fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, p. 1-749, 2004. Suplemento.

DABROWSKI, R.; KOSTRO, K.; LISIECKA, U.; SZCZUBIAL, M.; KRAKOWSKI, L. Usefulness of C-reactive protein, serum amyloid A component, and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early post-ovariohysterectomy complications. **Theriogenology**, v. 72, p. 471-476, 2009.

DAY, M. J.; MACKIN, A. J. Immune-mediated haematological disease. In: DAY, M. J. **Clinical immunology of the dog an cat**. 2 ed., London: Manson Publishing, 2008. p. 94-121.

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE H.; VERMEIRSCH, H.; VAN DEN BROECK, W.; CORYN, M. Cistic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected?, **Theriogenology**, v. 55 n.7, p. 1509-1519, 2001.

DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Veterinary Record**, v. 69, p. 1409-1415, 1957.

DOW, C. Experimental reproduction of the cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Journal Pathology Bacteriology**, v. 78, p. 267-277, 1959.

DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Veterinary Record**, v. 70, p. 1102-1108, 1958.

EMANUELLI, M. P. Hemograma, metabolismo oxidativo dos neutrófilos e peroxidação lipídica em cadelas com piometra por *Escherichia coli*. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Santa Maria, p. 38, 2007.

EVANGELISTA, L. S. M. **Alterações clínicas e laboratoriais em cadelas com piometra antes e após ovariosalpingohisterectomia**. 2009. 45. p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2009.

FELDMAN, E. C. O. Complexo hiperplasia endometrial cística/piometra e infertilidade em cadelas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna**

veterinária: doenças do cão e do gato. 5 ed, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. p. 1632-1669.

FERREIRA, L. N.; SOUZA, J. G. M.; SPADER, M. B.; XAVIER, F. S.; SILVA, F. S.; NOBRE, M. O.; T. C. Esplenomegalia com acentuada leucocitose em decorrência de piometra. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 16.; ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 9., 2007, Pelotas. 2007.

FIGUEIREDO, M. S. Impacto da inflamação na regulação do ferro e deficiência funcional de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 18-21, 2010. Suplemento, 2.

FRY, M. M. Anemia inflammatory, neoplastic, renal and endocrine diseases. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Ed.). **Schalm´s veterinary hematology**. 6. ed. Phennsilvania: [s.n.]: 2010. p. 246-250.

HAGMAN, R. New aspects of canine pyometra – studies on epidemiology and pathogenesis. **Theriogenology,** 2004. Tese (Doutorado) - University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2004.

HAGMAN, R. Clinical and molecular characteristics of pyometra in female dogs. **Theriogenology**, v. 47, p. 323-325, 2012.

HAGMAN, R.; KINDAHL, H.; FRNASSON, B. A.; BERGSTROM, A.; HOLST, B. S.; LAGERSTEDT, A. S. Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F2α metabolite analysis. **Theriogenology**, v. 66, p. 198-206, 2006.

JONAS, D.; SCHULTHEIS, B.; KLAS, C.; KRAMMER, P. H.; BHAKDI, S. Cytocidal effects of *Escherichia coli* hemolysin on human T lymphocytes. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 1715-1721, 1993.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 80-128, 1991.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. **Canine and feline theriogenology**. Phladelphia: WB Saunders Company, 2001. p. 206-224.

LEMOS, A. R.; ISMAEL, L. A. S.; BOALTO, C. C. M.; BORGES, M. T. F. B.; RONDÓ, P. H. C. Hepicidin as a biochemical parameter for the assessment of iron deficiency anemia. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 5, p. 596-599, 2010.

MADDENS, B.; DAMINET, S.; SMETS, P.; MEYER, E. Escherichia coli Pyometra induces transient glomerular and tubular dysfunction in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, p. 1263-1270, 2010.

MORLEY, P.; MATHES, M.; GUTH, A.; DOW, S. Anti-erythrocyte antibodies and disease associations in anemic and nonanemic dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 886-892, 2008.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Distúrbios da vagina e útero. In: _____. **Fundamentos da medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2006. p. 680-83.

NELSON, R. W.; FELDMAN, E. C. Pyometra em the bitch. In: MARROW, D. A. **Current therapy in theriogenology**: diagnosis, treatment and prevention of reprodutive diseases in small and large animals. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986. p. 1143.

NISKANEM, M.; THRUSFIELD, M. V. Association between age, parity, hormonal therapy and breed and pyometra in finnish dogs. **Veterinary Record**, v. 143, n. 18, p. 493-498, 1998.

OATES, P. S. The role hepicidin and ferroportin in iron absorption. **Histology and Histopathology**: cellular and molecular biology, v. 22, p. 791-804, 2007.

PASSARELLI D. **Resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico frente a membranas eritrocitárias autólogas de cães recentemente imunizados**. 2011. 109 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária de Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PRETZER, S. D. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. **Theriogenology**, v. 70, p. 359-363, 2008.

QUIGLEY, K. A.; BRIAN, J. C.; HAINES, D. M.; JACKSON, M. L. Application of a direct flow cytometric erythrocyte immunofluorescence assay in dogs with immune-mediated hemolytic anemia and comparison to the direct antiglobulin test. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 297-300, 2001.

RIETSCHEL, E. T. H.; SCHADE, V.; JENSEN, M. Bacterial endotoxins, chemical structures, biological activity and role in septicaemia. **Scandinavian Journal Infection Disease**, v. 31, p.8-21, 1983.

SUGIURA, K.; NISHIKAWA, M.; ISHIGURO, K.; TAJIMA, T.; INABA, M.; TORRI, R.; HATOYA, S.; WIJEWARDAN, V.; KUMAGAI, D.; TAMADA, H.; SAWADA, T.; IKEHARA, S.; INABA, T. Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. **Immunobiology**, v. 209, p. 619-627, 2004.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**: uma introdução. 6. ed. São Paulo: Roca, 2004. 532 p.

TRHALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPEBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 89-109.

WEISS, D.; TVEDTEN, H. Erythrocyte disorders. In: WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods.** 4. ed. St. Louis: Saunders, 2004. p. 38-62.

WILKERSON, M. J.; DAVIS, E.; SHUMAN, W.; HARKIN, K.; COX, J.; RUSH, B. Isotype-specific antibodies in horses and dogs with immune-mediated hemolytic anemia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 2, p. 190-196, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Dados Gerais dos animais do Grupo Controle. São Paulo 2014 - 2015

Número	Protocolo	Raça	Idd (anos)	Amostra
1	242.063	SRD	9	16.09.14
2	242.500	SRD	8	09.10.14
3	242.501	Poodle Médio	10	09.10.14
4	242.502	SRD	9	09.10.14
5	242.637	SRD	12	16.10.14
6	242.639	Yorkshire	9	16.10.14
7	242.640	Rottweiler	11	16.10.14
8	242.799	SRD	8	23.10.14
9	242.800	Labrador	10	23.10.14
10	242.802	SRD	7	23.10.14
11	242.803	Pinscher	6	23.10.14
12	242.863	SRD	8	29.10.14
13	242.864	SRD	10	29.10.14
14	242.865	Poodle Médio	11	29.10.14
15	242.866	Pinscher	10	29.10.14
16	243.796	SRD	8	06.01.15
17	243.797	SRD	7	06.01.15
18	243.798	Pinscher	7	06.01.15
19	243.799	Poodle Médio	6	06.01.15
20	243.800	Poodle Médio	6	06.01.15
21	243.987	SRD	7	15.01.15
22	243.988	Boxer	9	15.01.15
23	243.989	SRD	12	15.01.15
24	243.990	Poodle Médio	10	15.01.15
25	243.991	SRD	10	15.01.15
26	244.069	Pinscher	8	20.01.15
27	244.070	SRD	9	20.01.15
28	244.123	SRD	7	22.01.15
29	244.222	Labrador	9	28.01.15
30	244.223	SRD	10	28.01.15

Legenda: Idd: Idade; SRD: sem raça definida.

APÊNDICE B - Dados hematológicos dos animais do Grupo Controle. São Paulo 2014 - 2015

Nº	Protocolo	HT (%)	Hb (g/dl)	He ($x10^6$)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	Ret (%)	Leuc ($x 10^3$)	Seg (%)	Linf (%)	Mono (%)	Eosi (%)	Basóf (%)	Plq ($x10^3$)
1	242.063	46	15.4	6.9	67	22.2	33.2	raros	7.1	72	18	4	6		362
2	242.500	56	18.7	7.8	71.4	24	33.6	raros	8.8	70	17	5	8		395
3	242.501	45	15.3	5.9	76.6	26	33.9	raros	9.1	75	11	8	2		510
4	242.502	43	14.3	6.1	70.3	23.4	33.3	raros	8.5	62	15	8	15		568
5	242.637	46	14.7	6.5	70.7	22.5	31.9	raros	10.7	75	18	6	1		204
6	242.639	43	13.9	6	72	23.3	32.3	raros	11.0	66	20	9	5		260
7	242.640	47	14.8	6.2	75.9	23.9	31.4	raros	8.8	72	15	7	6		208
8	242.799	50	17.1	7.5	66.7	22.8	34.2	raros	7.6	84	13	3	0		406
9	242.800	46	14.4	6.6	69	21.7	31.4	raros	15.0	90	6	2	2		204
10	242.802	47	14.9	6.8	69	22.1	31.7	raros	9.4	80	4	2	0		508
11	242.803	52	16.2	7.5	69	21.7	31.1	raros	13.1	84	7	5	4		208
12	242.863	48	16	6.9	69.7	23.2	33.3	raros	15.0	78	11	6	5		298
13	242.864	49	15.7	6.6	73.5	23.7	32.2	raros	13.0	60	27	5	8		300
14	242.865	46	15.1	6.2	73.3	24.3	33.1	raros	6.4	75	15	8	2		455
15	242.866	56	19.4	7.9	70.7	24.5	34.6	raros	8.3	69	20	8	2	1	483
16	243.796	45	14.5	6.1	73.7	23.7	32.2	raros	9.0	83	11	4	2		332
17	243.797	47	14.9	6.1	77	24.4	31.7	raros	9.5	73	20	5	2		386
18	243.798	47	14.9	6.6	70.8	22.4	31.7	raros	6.9	69	20	9	2		331
19	243.799	55	17.7	8	68.8	22.1	32.2	raros	8.6	75	20	4	1		291
20	243.800	46	14.4	6.2	74.1	23.2	31.3	raros	12.1	70	20	6	4		476
21	243.987	56	18.1	8.1	69.1	22.3	32.3	raros	7.9	74	14	4	6		306
22	243.988	41	13.8	6	68.3	23	33.7	raros	9.9	72	15	6	7		470
23	243.989	48	15	6.7	71.6	22.3	31.3	raros	15.0	70	17	11	2		452
24	243.990	40	12.9	5.8	68.9	22.2	32.2	raros	7.0	71	21	5	3		207
25	243.991	40	12.8	5.9	67.8	21.7	32	raros	11.0	80	9	7	4		598
26	244.069	45	14.1	6.2	72.6	22.7	31.3	raros	9.5	79	14	5	2		437
27	244.070	57	18.3	7.6	75	24.1	32.1	raros	6.7	64	23	6	7		255
28	244.123	50	15.4	7.2	70	21	31	raros	11.7	78	16	3	2	1	443
29	244.222	46	14.7	6.5	70.7	22.6	31.9	raros	13.4	68	23	6	3		372
30	244.223	53	16.5	7.5	70.7	22	31.1	raros	10.2	75	15	7	3		433

Legenda: Nº: número; Ht: hematócrito; Hb: hemoglobina; He: hemácias; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; Ret: reticulócitos; Leuc: leucócitos; Seg: neutrófilos segmentados; Linf: linfócitos; Mono: monócitos; Eosi: eosinófilos; Basóf: basófilos; Plq: Plaquetas.

APÊNDICE C - Dados Gerais dos animais do Grupo Piometra. São Paulo 2014

Número	Protocolo	Raça	Idade (anos)	1ª coleta	2ª coleta
1	236.988	Yorkshire	12	07.01.14	13.01.14
2	237.029 (044)	SRD	12	08.01.14	17.01.14
3	237.173	SRD	6	14.01.14	27.01.14
4	237.197	SRD	14	15.01.14	22.01.14
5	237.201	SRD	16	15.01.15	21.01.14
6	237.060	SRD	9	21.01.14	30.01.14
7	237.367	Pinscher	11	22.01.14	03.02.14
8	237.362	Poodle Toy	13	22.01.15	03.02.14
9	224.903	SRD	10	23.01.14	03.02.14
10	237.451	Border Collie	14	27.01.14	10.02.14
11	217.488	Pinscher	6	29.01.14	10.02.14
12	237.620	Pit-Bull	11	03.02.14	10.02.14
13	237.700	Poodle Médio	6	06.02.14	18.02.14
14	237.912	Dogue Alemão	12	14.02.14	24.02.14
15	237.958	SRD	7	17.02.14	27.02.14
16	207.302 (238.021)	Pinscher	11	19.02.14	28.02.14
17	238.255	Poodle Toy	13	28.02.14	10.03.14
18	238.272	Poodle	13	06.03.14	13.03.14
19	238.276	Pit-Bull	8	06.03.14	13.03.14
20	238.424	Labrador	6	13.03.14	17.03.14
21	239.997	SRD	8	23.05.14	02.06.14
22	239.979	Cocker Spaniel	8	23.05.14	03.06.14
23	240.393	Labrador	5	16.06.14	26.06.14
24	240.415	Rottweiller	7	17.06.14	27.06.14
25	240.510	Lhasa Apso	10	25.06.14	07.07.14
26	240.599	Rottweiller	9	30.06.14	10.07.14
27	240.662	SRD	8	02.07.14	14.07.14
28	240.864	SRD	9	16.07.14	25.07.14
29	241.914	Poodle Médio	8	22.07.14	19.07.14
30	241.505	SRD	13	18.08.14	29.08.14
31	236.131	Border Collie	10	28.08.14	05.09.14
32	179.144	Pit-Bull	10	01.09.14	12.09.14
33	241.985	SRD	7	11.09.14	21.09.14

Legenda: SRD: sem raça definida

APÊNDICE D - Dados Hematológicos da primeira coleta (pré-operatório) dos animais do Grupo Piometra. São Paulo 2014

(continua)

Nº	Protocolo	HT (%)	Hb (g/dl)	He ($x10^6$)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	Ret (%)	Leuc ($x\ 10^3$)	Bast (%)	Seg (%)	Linf (%)	Mono (%)	Eosi (%)	Plq ($x10^3$)
1	236.988	29	10.2	4.5	64	23	35	0.6	6.2	0	64	14	22		140
2	237.029 (237.044)	42	15	7.1	59.5	20.7	34.8	0.14	36.1	3	79	5	13	raros	231
3	237.173	41	14.7	6.4	64	23	36	0.12	7.5	0	69	20	3	8	382
4	237.197	28	9.7	4.6	61.7	21.2	34.4	0.19	55.8	2	85	3	10		205
5	237.201	34	11.4	5.2	65.1	21.9	33.7	1.62	20.3	0	73	9	13	5	140
6	237.060	47	16.9	7.9	60	21	36	0.12	15.8	0	62	22	14	2	357
7	237.367	34	13.1	5.9	57.9	22.2	38.3	0.21	13	7	77	4	11	1	96
8	237.362	32	10.3	5.2	61.3	20	32.6	0.64	14.5	0	88	2	6	4	100
9	224.903	39	13.9	6.4	61.6	21.7	35.2	0.11	16.9	2	77	8	10	3	191
10	237.451	31	10.4	4.9	63.5	21.2	33.4	1.87	28.8	0	82	6	8	4	1.270
11	217.488	31	10.5	4.8	66	21.9	33.2	0.19	6.2	0	81	10	5	4	189
12	237.620	28	10	4.7	61	21	35	0.2	62.6	8	74	2	15	1	100
13	237.700	30	10.3	4.6	64	22	35	0.3	8.7	12	62	24	2		49
14	237.912	22	7.1	3.4	64	21	32	0.9	35.5	3	76	4	14	3	212
15	237.958	36	12.4	5,8	62	21	35	0.4	12.4	1	67	8	24		228
16	207.302 (238.021)	28	10	4.2	66	25	36	0.25	7.8	0	85	6	9		170
17	238.255	37	12.2	5.5	67	22	33	0.2	31.7	0	87	5	7	1	457
18	238.272	13	4.5	2.1	65	22	34	0.2	18.1	1	76	10	9	4	361
19	238.276	18	6.7	2.7	66	25	37	0.6	37.1	0	58	13	20	9	213
20	238.424	31	10.6	5.1	62	21	34	0.4	14.8	0	56	22	21	1	96

(conclusão)

Nº	Protocolo	HT (%)	Hb (g/dl)	He ($x10^6$)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	Ret (%)	Leuc ($x\ 10^3$)	Bast (%)	Seg (%)	Linf (%)	Mono (%)	Eosi (%)	Plq ($x10^3$)
21	239.997	44	15.9	7	63	23	36	0.3	22.1	0	81	8	10	1	219
22	239.979	39	14.2	6.3	63	23	36	0.7	44.1	0	91	4	5		246
23	240.393	33	11.6	5	66	23	35	0.56	39.6	0	73	9	15	3	351
24	240.415	35	12	5.4	65	23	35	0.4	33.2	0	75	6	19		145
25	240.510	34	11.7	5.5	63	22	34	0.23	54.2	2	76	8	13	1	84
26	240.599	38	12	5.9	64	20	32	0.23	44	1	67	6	25		429
27	240.662	30	10.2	4.8	62	21	34	0.13	36.8	3	69	11	16	1	191
28	240.864	39	13	6.2	63	21	33	2.26	66.7	2	81	7	10		115
29	241.914	38	13.5	5.8	66	23	35	0.15	3.4	0	78	18	2	2	82
30	241.505	37	12.9	5.7	65	23	35	0.17	77.3	1	76	2	20	1	279
31	236.131	24	8.1	3.6	66	23	34	2.04	30.2		66	5	27	2	459
32	179.144	35	12.5	5.6	64	23	36	0.38	30.2	3	71	4	19	3	399
33	241.985	37	12.4	5.6	66	22	33	0.22	43.7		91	3	4	2	221

Legenda: Nº: número; Ht: hematócrito; Hb: hemoglobina; He: hemácias; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; Ret: reticulócitos; Leuc: leucócitos; Bast: neutrófilos bastonetes; Seg: neutrófilos segmentados; Linf: linfócitos; Mono: monócitos; Eosi: eosinófilos; Plq: Plaquetas.

APÊNDICE E - Dados Hematológicos da segunda coleta (pós-operatório) dos animais do Grupo Piometra. São Paulo 2014

(continua)

Nº	Protocolo	HT (%)	Hb (g/dl)	He ($x10^6$)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	Ret (%)	Leuc ($x\ 10^3$)	Bast (%)	Seg (%)	Linf (%)	Mono (%)	Eosi (%)	Basóf (%)	Plq ($x10^3$)
1	236.988	18	5.9	2.7	67	22	33	1.74	37.9	1	67	14	16	2		558
2	237.029 (237.044)	45	15.6	7.5	60.5	20.9	34.6	0.15	54.9		93	2	3			255
3	237.173	33	10.9	5.1	63.4	21.2	33.4	1.91	4.2		42	45	6	7		71
4	237.197	16	5.2	2.5	66.3	21	31.8	3.7	44.3		91	1	7	1		712
5	237.201	28	9.2	4.1	67.3	22.3	33.1	3.06	12.6		69	22	3	5	1	271
6	237.060	41	13.7	6.6	61.2	20.7	33.9	0.15	10		60	31	5	4		274
7	237.367	19	6.2	3.2	58.5	19.2	32.9	1.81	64.6	2	86	6	6			373
8	237.362	39	13	6.3	63	20.8	33.1	1.42	3.8		83	3	8	6		468
9	224.903	37	12.4	5.7	64.3	21.7	33.8	5.04	11.1		66	28	3	3		866
10	237.451	37	11.7	5.1	72.2	22.8	31.6	3.3	14.3		58	28	7	7		980
11	217.488	38	12.6	5.7	67.1	22.1	32.9	0.6	10.3		70	19	3	8		402
12	237.620	20	6.3	3	64.9	20.9	32.1	2.3	18.3		82	10	3	5		455
13	237.700	35	11.5	4.9	72	24	33	0.5	8.2		44	43	6	6	1	920
14	237.912	29	9.5	4.4	66	21.8	33.1	1.4	6.6		66	27	5	2		866
15	237.958	27	9.1	4.2	63.1	21.4	33.8	1	11		61	17	4	18		901
16	207.302 (238.021)	42	14.2	6.2	68.8	23.1	33.5	1.2	9.3		67	21	6	5	1	506
17	238.255	43	14.1	6.2	70.3	22.9	33.8	1	21.7		74	13	3	10		1257
18	238.272	24	8.3	3.8	64.9	22.1	35.1	0.2	11		56	28	5	10	1	640

(conclusão)

Nº	Protocolo	HT (%)	Hb (g/dl)	He (x10^6)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	Ret (%)	Leuc (x 10^3)	Bast (%)	Seg (%)	Linf (%)	Mono (%)	Eosi (%)	Basóf (%)	Plq (x10^3)
19	238.276	25	7.6	3.3	74.1	23	31	5.2	18		69	21	6	4		805
20	238.424	38	12.6	6.2	60.9	20.4	33.4	0.3	14.8		83	9	8			457
21	239.997	41	14	6.1	66.6	23	33.7	1.5	12.5		69	22	4	5		644
22	239.979	41	14	6.4	64.3	22.4	34.6	0.89	9.6		76	16	7	1		893
23	240.393	30	10	4.3	69.4	23.3	33.6	6.11	15.2		82	10	5	3		553
24	240.415	39	11.9	5.3	73.7	22.6	30.7	5.39	14.6		74	14	4	8		861
25	240.510	37	12	5.5	67	22	33	2.1	14.7		60	26	10	3	1	513
26	240.599	24	7.5	3.5	66.7	21.2	31.9	8.47	19.4		74	12	6	8		1044
27	240.662	24	7.8	3.7	65	21	33	7.48	15.3		90	8	1	1		518
28	240.864	35	11.7	5.5	63.6	21.3	33.4	6.6	14.9		72	21	2	5		574
29	241.914	39	12.6	5.5	70.2	23.1	32.9	4.01	22.6		78	15	5	2		1025
30	241.505	30	9.8	4.2	72.5	23.4	32.3	10.9	19.5		68	19	8	5		878
31	236.131	18	5.6	2.5	72.5	22.7	31.3	11.2	19.7		79	8	8	5		1054
32	179.144	31	10.8	4.8	65.6	22.6	33.9	1.78	7.1		64	17	4	15		931
33	241.985	34	10.7	4.7	72.3	22.8	31.5	2.83	17.5		76	12	3	7		809

Legenda: Nº: número; Ht: hematócrito; Hb: hemoglobina; He: hemácias; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; Ret: reticulócitos; Leuc: leucócitos; Bast: neutrófilos bastonetes; Seg: neutrófilos segmentados; Linf: linfócitos; Mono: monócitos; Eosi: eosinófilos; Plq: Plaquetas.

APÊNDICE F - Valores absolutos de reticulócitos do Grupo Piometra. São Paulo 2014

		Piometra – Reticulócitos (/µL)	
Número	**Protocolo**	**Pré-operatório**	**Pós-operatório**
1	236.988	27.000	46.980
2	237.029 (237.044)	9.940	11.250
3	237.173	7.680	97.410
4	237.197	8.740	92.500
5	237.201	84.240	125.460
6	237.060	9.480	9.900
7	237.367	12.390	57.920
8	237.362	33.280	89.460
9	224.903	7.040	287.280
10	237.451	91.630	168.300
11	217.488	9.120	34.200
12	237.620	9.400	69.000
13	237.700	13.800	24.500
14	237.912	30.600	61.600
15	237.958	23.200	42.000
16	207.302 (238.021)	10.500	74.400
17	238.255	11.000	62.000
18	238.272	4.200	7.600
19	238.276	16.200	171.600
20	238.424	20.400	18.600
21	239.997	21.000	91.500
22	239.979	44.100	56.960
23	240.393	28.000	262.730
24	240.415	21.600	285.670
25	240.510	12.650	115.500
26	240.599	13.570	296.450
27	240.662	6.240	276.760
28	240.864	140.120	363.000
29	241.914	8.700	220.550
30	241.505	9.690	457.800
31	236.131	73.440	280.000
32	179.144	21.280	85.440
33	241.985	12.320	133.010

ANEXOS

ANEXO A -Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PROPRIETÁRIO OU RESPONSÁVEL

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO .....

Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP:.....TELEFONE:(.....).....

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

2. NOME DO ANIMAL E/OU NÚMERO DE REGISTRO (TATUAGEM, MICROCHIP, BRINCO)

.....

ESPÉCIE:..... RAÇA:.....
PELAGEM:.....

SEXO:..... DATA DE NASCIMENTO: .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

3. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

"Caracterização da anemia em cadelas com piometra."

PESQUISADOR: Fábio Novelli Martorelli. CARGO/FUNÇÃO: Médico Veterinário.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 19.886.

4. Departamento: Clínica Médica

5. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ⊗ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

6. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Seu animal está sendo convidado a participar da pesquisa "Caracterização da anemia em cadelas com piometra" de cães atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Trata-se de um estudo experimental testando a hipótese de que o aumento de gamaglobulinas circulantes causado pela piometra, pode levar a uma destruição precoce dos eritrócitos. Sua colaboração é importante e necessária para o desenvolvimento da pesquisa, porém sua participação é voluntária. A qualquer instante você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação ao pesquisador ou a instituição, nem lhe trará qualquer tipo de represália. Sua participação consistirá em permitir a coleta e o uso do sangue do seu animal. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais, sendo que asseguramos o total sigilo sobre sua participação. Você poderá solicitar informações ou esclarecimentos sobre o andamento da pesquisa em qualquer momento com o pesquisador responsável.

Se você entendeu claramente as informações acima, concorda com todos os termos, acredita ter sido suficientemente informado através deste termo e de explicações pessoais prestadas e, além disso, aceita participar de livre e espontânea vontade da pesquisa em curso, preencha e assine o campo abaixo onde consta "voluntário" e coloque a data de hoje:

São Paulo, _____ de _____ de _____

Nome do voluntário	**Assinatura do voluntário**

Pesquisador responsável:

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste proprietário para a participação de seu(s) animal(is) neste estudo.

_____

Fábio Novelli Martorelli
Médico Veterinário
CRMV/SP: 19.886

ANEXO B - Ficha de Anamnese preenchida durante atendimento dos animais no Serviço de Obstetrícia / Ginecologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
HOSPITAL VETERINÁRIO
SERVIÇO DE OBSTETRÍCIA / GINECOLOGIA

Registro _____

Espécie ☐ canina

Raça _____

Idade _____

Data _____

ANAMNESE

I. Queixa principal:

_____

_____

_____

_____

II. Histórico reprodutivo:

1. Ciclo estral

☐ desconhecido ☐ animal castrado _____ ☐ irregular

☐ regular > ☐ semestral ☐Outros

_____

Duração do cio _____último cio _____

2. Gestações

☐ desconhecido ☐ nulípara ☐ primípara ☐ plurípara

☐ partos eutócicos

☐ partos distócicos ☐ ocitócicos ☐ tração forçada ☐ cesariana

Último parto _____

3. Pseudociese

☐ desconhecido ☐ frequente ☐ esporádica ☐ nunca apresentou

Medicação utilizada _____

4. Uso de anti-concepcionais

☐ desconhecido ☐ frequente ☐ esporádico ☐ nunca utilizou

Medicação utilizada _____

III. Outros sistemas:

1. Sistema cárdio-respiratório (início dos sintomas _____)

☐ NDN ☐ cansaço fácil ☐ tosse ☐ outros

2. Sistema digestivo (início dos sintomas _____)

☐ normorexia ☐ hiporexia ☐ anorexia

☐ normodipsia ☐oligodipsia ☐ polidipsia

☐ normoquesia ☐ aquesia ☐ diarréia

☐ fezes hipercólicas ☐ fezes sanguinolentas

☐ episódios eméticos_____ outros _____

3. Sistema genito-urinário

☐ normúria ☐ oligúria ☐ anúria

☐ polaquiúria ☐ poliúria ☐ disúria

outros _____

Corrimento vaginal

☐ ausente

☐ presente > ☐ mucoso ☐ purulento ☐ sanguinolento

☐ esverdeado ☐ outros _____

4. Informações complementares:

_____

_____

_____

EXAME CLÍNICO

1. Temperatura _____ ºC mucosas _____ linfonodos _____

hidratação _____

2. Auscultação

_____

_____

_____

3. Palpação

_____

_____

_____

4. Vulva _____

_____

5. Vagina _____

_____

Ectoparasitas: ☐ Puliciose ☐ Ixodidiose

Histórico de Ectoparasitas:_____

Vacinação: Tipo?_____

Quando?_____

Contactantes: ☐ Sim ☐ Não Quantos?_____

Ambiente: ☐ Domiciliado ☐ Semi-domiciliado ☐ acesso à rua

☐ Urbano ☐ Rural

Dieta: ☐ ração ☐ comida caseira

Medicação Anterior:_____

Responsável:

Médico Veterinário: _____

Estagiário: _____