AUGUSTO CESAR DIAS DOS SANTOS

**Avaliação da predisposição genética e fatores preditivos para
o desenvolvimento do choque séptico em cadelas acometidas por
piometra**

São Paulo
2014

AUGUSTO CESAR DIAS DOS SANTOS

**Avaliação da predisposição genética e fatores preditivos para o
desenvolvimento do choque séptico em cadelas acometidas por piometra**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária 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:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientadora:

Profa. Dra. Silvia Renata Gaido
Cortopassi

São Paulo
2014

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.3049
FMVZ

Santos, Augusto Cesar Dias dos

Avaliação da predisposição genética e fatores preditivos para o desenvolvimento do choque séptico em cadelas acometidas por piometra / Augusto Cesar Dias dos Santos. -- 2014.

148 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Profa. Dra. Silvia Renata Gaido Cortopassi.

1. Cadelas. 2. Piometra. 3. Sepse. 4. Inflamação. 5. Genética. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Avaliação da predisposição genética e fatores preditivos para o desenvolvimento do choque séptico em cadelas acometidas por piometra”, protocolado sob o nº 2471/2011, utilizando 100 (cem) cachorros, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Silvia Renata Gaido Cortopassi, 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 e foi aprovado em reunião de 23/11/2011.

We certify that the Research “Assessment of genetic predisposition and predictive factors for the development of septic shock in bitches affected by pyometra”, protocol number 2471/2011, utilizing 100 (one hundred) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Silvia Renata Gaido Cortopassi, 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 and was approved in the meeting of day 11/23/2011.

São Paulo, 21 de julho de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

HOSPITAL VETERINÁRIO

À Ilustríssima Senhora
Professora Doutora **Silvia Renata Gaido Cortopassi**

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto "Avaliação da predisposição genética para o desenvolvimento do choque séptico em cadela acometidas por piometra" desenvolvido pelo Pós-Graduando Augusto Cesar Dias dos Santos e sob a sua responsabilidade, previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais dessa Faculdade, foi analisado e atende às normas da Comissão de Ética deste Hospital, que acompanhará administrativamente sua execução. Substituição do responsável, inserção de novos colaboradores e mudanças na metodologia proposta deverão ser imediatamente comunicadas a esta Comissão, bem como, as datas de suspensão ou término do projeto.

São Paulo, 02 de julho de 2012

Prof. Dr. Fernando José Benesi
Presidente da Comissão de Ética Hospitalar
HOVET-FMVZ-USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTOS, Augusto Cesar Dias dos

Título: Avaliação da predisposição genética e fatores preditivos para o desenvolvimento do choque séptico em cadelas acometidas por piometra

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária 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: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Miguel Velho, Ignês Frizzo Velho, Filomena Dias dos Santos e Orlando Dias dos Santos.

Aos amados pais, Regina Stella Dias dos Santos e Orcelide Dias dos Santos.

À minha irmã, Sylvia Regina Dias dos Santos.

À esposa, Sandra Cássia Braga dos Santos.

Aos mais que amigos, fonte do meu amor e inspiração pela minha tão especial profissão.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora e amiga,

Profa. Dra. Silvia Renata Gaido Cortopassi

Agradeço pela confiança e credibilidade recebida ao longo da minha vida profissional, pela compreensão e oportunidade de realizar esta pesquisa e pelos inúmeros ensinamentos profissionais e principalmente pessoais.

Sempre serei grato pelo carinho e amizade, mais fortificados pelo desafio realizado.

AGRADECIMENTOS

À médica veterinária, mestre em anestesiologia e amor daminha vida **Sandra Cássia Braga dos Santos**, pelo apoio, compreensão, lições, amor, dedicação, cumplicidade, companheirismo em todos os aspectos da minha vida.

Aos meus avós **Miguel Velho, Ignês Frizzo Velho, Filomena Dias dos Santos** e **Orlando Dias dos Santos** pela vida que me proporcionaram, amor, ensinamentos, amizade e dedicação.

Aos meus pais **Regina Stella Dias dos Santos** e **Orcelide Dias dos Santos**, pela honestidade e moral digna que me ensinaram a seguir, pelo amor e anos de dedicação, por acreditarem que sou capaz muitas vezes mais do que eu mesmo.

À irmã **Sylvia Regina Dias dos santos**, por tudo que concerne nossa amizade e amor.

À **FAPESP**, pelo apoio e incentivo para a realização desta pesquisa.

À minha prima, **Mariliza Velho** pela paciência e pelos ensinamentos, que sem eles não teria realizado esse trabalho e pela amizade.

À Profa. **Clair Motos de Oliveira**, pela amizade, orientação e colaboração na realização desse projeto.

À Profa. **Denise Tabachi Fantoni**, pela amizade e orientação profissional.

À Profa. **Helenice de Souza Spinosa**, pela amizade, orientação profissional, paciência e ensinamentos.

À Profa. **Cristina Massoco**, pela amizade, orientação profissional e colaboração na realização deste projeto.

À Profa. **Julia Maria Matera**, pela amizade e incentivo na realização deste projeto.

Aos amigos e companheiros de profissão **Marcelo Faustino, Mariana Semião Francisco Talib, Geni Cristina Patricio, Patricia Bonifácio Flor e Samantha Ive Miyashiro** pela colaboração na realização deste projeto e acima de tudo pela amizade.

Aos amigos, **Nicole Gilda Teixeira de Queiroz Hazarbassanov, Vagner Gonçalves Júnior e Herculano Pinho Pereira**, pelo inestimável auxílio e paciência para a realização deste projeto.

À amiga, **Graça Correia Rosas**, pelo auxílio para a realização deste projeto.

Aos enfermeiros e amigos, **Jesus dos Anjos Vieira, Otávio Rodrigues dos Santos, José Miron de Oliveira da Silva**, indispensáveis para a realização desse projeto.

Aos enfermeiros e amigos, **Elizabeth da Silva Martins, Nelson de Jesus e Laércio Antônio da Silva** pelo apoio técnico.

Aos amigos, **Edvaldo José Tagino, Helena Sayoko Matsunaga, Joselma Gomes da Silva, Josenilda Maria da Silva**, pelo apoio e colaboração burocrática para a realização desse projeto.

À todos os pacientes e proprietários envolvidos no projeto, pela paciência e confiança.

Aos meus filhos, que mesmo sem saber verbalizar são fonte inesgotável e inestimável de amor e companheirismo, pelas lições que só a dedicação e convívio nos faz perceber e compreender.

EPÍGRAFE

“Se você pensa que é um derrotado,
Você será derrotado.

Se não pensar, quero intensamente,
Não conseguirá nada.

Mesmo que queira vencer,
Mas pensa que não vai conseguir,
A vitória não sorrirá para você.

Se você fizer as coisas pela metade,
Você será um fracassado
Nós descobrimos, neste mundo,
Que o sucesso começa pela intenção da gente
E tudo se determina pelo nosso espírito.

Se você pensa que é um malogrado
Você se torna como tal.
Se você almeja atingir uma posição mais elevada deve,
Antes de obter a vitória,
Dotar-se da convicção de que conseguirá infalivelmente.

A luta pela vida nem sempre é vantajosa
Aos fortes, nem aos espertos
Mas cedo ou mais tarde,
Quem cativa a vitória é aquele que crê plenamente:
Eu conseguirei!”

RESUMO

SANTOS, A. C. D. **Avaliação da predisposição genética e fatores preditivos para o desenvolvimento do choque séptico em cadelas acometidas por piometra.** [Assessment of genetic predisposition and predictive factors for the development of septic shock in bitches affected by pyometra]. 2014. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A piometra canina é uma infecção bacteriana que acomete o útero de cadelas sexualmente maduras e gera a síndrome clínica conhecida como sepse e síndrome da resposta inflamatória sistêmica. Quando não tratada adequadamente ocorre a progressão da doença para estágios mais graves como a sepse grave e o choque séptico. Embora as alterações ocasionadas pela infecção serem conhecidas, o correto estadiamento da gravidade do quadro ainda é um obstáculo. O processo de inflamação sistêmica é complexo, o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina 1 β (IL-1 β) aparecem como mediadores inflamatórios centrais nos casos de sepse. Estudos recentes do DNA de pacientes em choque séptico têm demonstrado a presença de mutações ou polimorfismos que exercem grande influência na produção do TNF- α e da IL-1 β . Com exceção da avaliação sérica de lactato, a proteína C reativa (CRP) é o biomarcador mais utilizado em testes clínicos para o diagnóstico e tratamento da sepse. Os objetivos principais do estudo foram avaliar a gravidade do caso; as alterações sistêmicas e metabólicas do paciente no período pré-operatório; as concentrações plasmáticas do TNF- α , IL-1 β , IL-6 e CRP no momento do diagnóstico; a presença de polimorfismos na região decodificadora do TNF- α e da IL-1 β . Foram incluídas 9 cadelas sem piometra e 85 com piometra, afecção diagnosticada a partir do histórico e dos sinais clínicos identificados por meio do exame físico e ultrassonografia abdominal; e foram estratificadas para a gravidade do caso em sepse, sepse grave ou choque séptico. As variáveis clínicas e laboratoriais foram coletadas no momento do diagnóstico e confrontadas estatisticamente pelo método de comparações múltiplas. Os resultados mostraram 23 (24,4%) animais em sepse, 60 (63,82%) em sepse grave e dois (2,12%) em choque séptico. As alterações mais significativas foram observadas nos animais com sepse grave e em choque séptico e pode-se destacar a variação no tempo de preenchimento capilar, na pressão arterial, na contagem leucocitária, na

albuminemia, na fosfatase alcalina, na creatinina, no pH, na CRP e na IL-6. O exame do gene da IL-1 β demonstrou que os animais em sepse com o alelo GG apresentam níveis séricos de IL-1 β mais elevados. Foi possível concluir que a estratificação da gravidade do caso para os animais em sepse grave é muito branda e não distingue os animais em estado mais grave dos menos grave dentro do mesmo grupo; que o estadiamento da gravidade poder ser realizado com avaliações corriqueiras e empregadas de forma rotineira no atendimento dos pacientes; que a proteína C reativa e a IL-6 apresentam correlação direta com a gravidade do caso; e que o polimorfismo do gene da IL-1 β e o tempo decorrido entre o início dos sintomas até que os proprietários procurassem ajuda médica foram os de maior influência sobre a gravidade do caso.

Palavras-chave: Cadelas. Piometra. Sepse. Inflamação. Genética.

ABSTRACT

SANTOS, A. C. D. **Assessment of genetic predisposition and predictive factors for the development of septic shock in bitches affected by pyometra.** [Avaliação da predisposição genética e fatores preditivos para o desenvolvimento do choque séptico em cadelas acometidas por piometra]. 2014. 148 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Canine pyometra is a bacterial infection that affects the uterus of sexually mature bitches and generates the clinical syndrome known as sepsis and systemic inflammatory response syndrome. When not treated properly the disease progression to more severe stages as severe sepsis and septic shock occurs. Although the changes caused by the infection are known, the correct staging of the severity of the condition is still an obstacle. The process of systemic inflammation is complex, tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin 1 β (IL-1 β) appear as central inflammatory markers in sepsis. Recent studies of DNA from patients in septic shock have shown the presence of mutations or polymorphisms that exert great influence on the production of TNF- α and IL-1 β . Except the assessment of serum lactate, C-reactive protein (CRP) is the most widely used biomarker in clinical trials for the diagnosis and treatment of sepsis. The main objectives of the study were to evaluate the severity of the case, systemics and metabolics changes in the patient preoperatively, plasma concentrations of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and CRP at the time of diagnosis; the presence of polymorphisms in the decoding region of the TNF- α and IL-1 β . In the study was included 9 bitches without pyometra and 85 bitches with pyometra, disease was diagnosed from the history and clinical signs identified through physical examination and abdominal ultrasonography; and were stratified according to the severity of the case in sepsis, severe sepsis or septic shock. The clinical and laboratory variables were collected at diagnosis and compared statistically by the method of multiple comparisons. The results showed 23 (24.4%) animals with sepsis, 60 (63.82%) in two and severe sepsis (2.12%) in septic shock. The most significant changes were observed in animals with severe sepsis and septic shock and can highlight the variation in capillary refill time, blood pressure, leukocyte count, the albumin, alkaline phosphatase, creatinine, pH, CRP and IL-6. Examination of the IL-1 β gene showed that animals with sepsis with GG allele have higher levels of seric IL-1 β . It was

concluded that the stratification of the severity of the case for animals in severe sepsis is very bland and does not distinguish the animals in a more severe state of less severe within the same group; the staging of gravity can be done with ordinary ratings and employed routinely in patient care; the C reactive protein and IL-6 show a direct correlation with the severity of the case; and the polymorphism of the IL-1 β and the time elapsed between the onset of symptoms until the owners sought medical help were the most influence on the severity of the case.

Keywords: Bitches. Pyometra. Sepsis. Inflammation. Genetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação gráfica demonstrando a placa de 96 poços para o teste ELISA da CRP com respectivos poços padrão (ng/ml), branco (BLK), controle (CTL) e amostras (SPL) – São Paulo – 2012/2014	49
Figura 2 -	Representação gráfica demonstrando a curva de calibração das concentrações padrão da CRP – São Paulo – 2012/2014	50
Figura 3 -	Representação gráfica demonstrando a placa de 96 poços para o teste ELISA do TNF- α com respectivos poços padrão (pg/ml), branco (BLK), controle (CTL) e amostras (SPL) – São Paulo – 2012/2014	51
Figura 4 -	Representação gráfica demonstrando a curva de calibração das concentrações padrão do TNF- α – São Paulo – 2012/2014	51
Figura 5 -	Representação gráfica demonstrando a placa de 96 poços para o teste ELISA da IL-1 β com respectivos poços padrão (ng/ml), branco (BLK) e amostras (SPL) – São Paulo – 2012/2014	52
Figura 6 -	Representação gráfica demonstrando a curva de calibração das concentrações padrão da IL-1 β – São Paulo – 2012/2014	52
Figura 7 -	Representação gráfica demonstrando a placa de 96 poços para o teste ELISA da IL-6 com respectivos poços padrão (pg/ml), branco (BLK) e amostras (SPL) – São Paulo – 2012/2014	53
Figura 8 -	Representação gráfica demonstrando a curva de calibração das concentrações padrão da IL-6 – São Paulo – 2012/2014	54
Figura 9 -	Representação gráfica demonstrando a variação das disfunções de órgãos das cadelas acometidas por piometra em sepse grave – São Paulo – 2012/2014	60
Figura 10 -	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da frequência cardíaca (batimentos por minuto) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	63
Figura 11 -	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do tempo de preenchimento capilar no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	64

Figura 12 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da pressão arterial sistólica (milímetros de mercúrio) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	65
Figura 13 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da pressão arterial diastólica (milímetros de mercúrio) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	66
Figura 14 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da frequência respiratória (movimentos por minutos) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	67
Figura 15 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da temperatura (graus Celsius) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	68
Figura 16 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da glicemia (miligramas por decilitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	69
Figura 17 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do número de hemácias no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	70
Figura 18 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão quantidade de hemoglobina (gramas por decilitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	71
Figura 19 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do hematócrito no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	72

Figura 20	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da contagem de leucócitos no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	73
Figura 21	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão na contagem de plaquetas no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	74
Figura 22	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão de proteína total (gramas por decilitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	75
Figura 23	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão de albumina (gramas por decilitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	76
Figura 24	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão de alanina aminotransferase (unidades por litro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	77
Figura 25	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da fosfatase alcalina (unidades por litro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	78
Figura 26	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão de ureia (miligramas por decilitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	79
Figura 27	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão de creatinina (gramas por decilitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	80

Figura 28 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do lactato (milimol por litro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	81
Figura 29 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do lactato sistêmico (milimol por litro) coletado no trans-operatório e do lactato coletado da veia uterina dos animais com piometra – São Paulo – 2012/2014	82
Figura 30 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do pH no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	83
Figura 31 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da pressão parcial de oxigênio venoso (milímetros de mercúrio) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	84
Figura 32 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da pressão parcial de gás carbônico venoso (milímetros de mercúrio) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	85
Figura 33 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do bicarbonato (miliequivalentes por litro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	86
Figura 34 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da saturação de oxigênio venosa no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	87
Figura 35 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do excesso de base no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	88

Figura 36	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão de proteína C reativa (nanograma por mililitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	89
Figura 37	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do fator de necrose tumoral (picograma por mililitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	90
Figura 38	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da interleucina 1 β (nanograma por mililitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	91
Figura 39	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da interleucina 6 (picograma por mililitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	92
Figura 40	-	Representação gráfica demonstrando a frequência dos genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014	94
Figura 41	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α - pg/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014	95
Figura 42	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de interleucina 1 beta (IL-1 β - ng/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014	96
Figura 43	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de interleucina 6 (IL-6 – pg/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014	96

Figura 44	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de proteína c reativa (CRP – ng/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014	97
Figura 45	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de lactato (mmol/L) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014	97
Figura 46	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados da glicemia (mg/dl) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014	98
Figura 47	-	Representação gráfica demonstrando a frequência dos genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas controle incluídas na pesquisa – São Paulo – 2012/2014	99
Figura 48	-	Representação gráfica demonstrando a frequência dos genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra e em sepse incluídas na pesquisa – São Paulo – 2012/2014	99
Figura 49	-	Representação gráfica demonstrando a frequência dos genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra e em sepse grave incluídas na pesquisa – São Paulo – 2012/2014	100
Figura 50	-	Representação gráfica demonstrando a frequência dos genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra e em choque séptico incluídas na pesquisa – São Paulo – 2012/2014	100
Figura 51	-	Representação gráfica demonstrando a frequência dos genótipos referente ao gene da IL-1 β e a gravidade da sepse, excluindo os animais em choque séptico – São Paulo – 2012/2014	101
Figura 52	-	Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de interleucina 1 beta (IL-1 β - ng/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse – São Paulo – 2012/2014	103

Figura 53 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de interleucina 6 (IL-6 – pg/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse – São Paulo – 2012/2014	103
Figura 54 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de proteína C reativa (CRP – ng/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse – São Paulo – 2012/2014	104
Figura 55 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de lactato (mmol/L) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse – São Paulo – 2012/2014	104
Figura 56 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados da glicemia (mg/dl) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse – São Paulo – 2012/2014	105
Figura 57 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α - pg/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse grave– São Paulo – 2012/2014	106
Figura 58 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de interleucina 1 beta (IL-1 β - ng/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse grave – São Paulo – 2012/2014	106
Figura 59 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de interleucina 6 (IL-6 – pg/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse grave– São Paulo – 2012/2014	107
Figura 60 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de proteína C reativa (CRP – ng/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse grave – São Paulo – 2012/2014	107

Figura 61 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de lactato (mmol/L) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse grave – São Paulo – 2012/2014	108
Figura 62 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados da glicemia (mg/dl) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse grave – São Paulo – 2012/2014	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Idade (anos) e peso (kg) dos animais controle, com piometra em sepse, em sepse grave e em choque séptico no momento do atendimento – São Paulo – 2012/2014	59
Tabela 2	- Valores médios e desvios-padrão da média das variáveis estudadas no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014	62
Tabela 3	- Valores médios e desvios-padrão da média da quantidade de lactato sistêmico coletado no trans-operatório e da quantidade de lactato coletado da veia uterina das cadelas com piometra – São Paulo – 2012/2014	82
Tabela 4	- Frequência dos genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014	94
Tabela 5	- Associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β e os níveis dosados do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α - pg/ml), interleucina 1 beta (IL-1 β - ng/ml), interleucina 6 (IL-6 – pg/ml), proteína c reativa (CRP – ng/ml), lactato (mmol/L) e glicemia (mg/dl), de maneira independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014	98
Tabela 6	- Associação entre os genótipos do polimorfismo referente ao gene da IL-1 β e gravidade da sepse – São Paulo – 2012/2014	101
Tabela 7	- Associação entre os genótipos do polimorfismo referente ao gene da IL-1 β e a gravidade da sepse, excluindo os animais em choque séptico – São Paulo – 2012/2014	102
Tabela 8	- Média e desvio padrão da média dos níveis de interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), proteína C reativa (CRP), lactato e glicemia nas cadelas com piometra em sepse – São Paulo – 2012/2014	105
Tabela 9	- Média e desvio padrão da média dos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), proteína C reativa (CRP), lactato e glicemia nas cadelas com piometra em sepse grave – São Paulo – 2012/2014	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
BE	Excesso de base
bpm	batimentos por minuto
°C	Graus Celsius
CP	Contagem de plaquetas
d.p.	desvio padrão
dl	Decilitros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPS	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FA	Fosfatase alcalina
FC	Frequência cardíaca
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
FR	Frequência respiratória
HCO ₃	Bicarbonato
He	Hemácias
Hg	Hemoglobina
Ht	Hematócrito
IL	Interleucina
IRA	Insuficiência renal aguda
Kg	quilogramas
L	Litros
LPS	Lipopolissacarídeos
mg	miligramas
min	minutos
ml	mililitros
mm ³	milímetros cúbicos
mmHg	milímetros de mercúrio
mmol	milimol
mov	movimentos
nm	nanômetros

PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PAS	Pressão arterial sistólica
CRP	Proteína C reativa
pH	potencial hidrogeniônico
PMADs	Padrões moleculares associados ao dano
PMN	Polimorfonucleares
PT	Proteína total
PvO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue venoso
PvCO ₂	Pressão parcial de gás carbônico no sangue venoso
rpm	rotações por minuto
RTLs	Receptores <i>Toll-like</i>
SAP	Shrimp alkaline phosphatase
seg	segundos
SFMO	Síndrome da falência de múltiplos órgãos
SRAC	Síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SRD	Sem raça definida
SvO ₂	Saturação de oxigênio no sangue venoso
TPC	Tempo de preenchimento capilar
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
U	Unidades
μ l	microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DE LITERATURA	30
2.1	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA PIOMETRA	32
2.2	ACHADOS LABORATORIAIS	33
2.3	ETIOLOGIA E PATOGÊNESE	34
2.4	BIOMARCADORES DA SEPSE	37
2.4.1	Citocinas pró-inflamatórias	37
2.4.2	Proteína C reativa	39
2.4.3	Biomarcadores da disfunção de órgãos	40
3	HIPÓTESE	42
4	OBJETIVOS	43
5	MATERIAL E MÉTODO	44
5.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO	44
5.2	ANIMAIS	44
5.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	44
5.4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	45
5.5	AVALIAÇÃO CLÍNICA	46
5.5.1	Pressão arterial	46
5.5.2	Frequência cardíaca e respiratória	47
5.5.3	Temperatura retal, tempo de perfusão e coloração de mucosas	47
5.5.4	Avaliação metabólica	47
5.5.5	Hemograma, bioquímica renal e hepática	48
5.5.6	Prova de resposta inflamatória	48
5.5.6.1	Dosagem de proteína C reativa	49
5.5.6.2	Níveis séricos de TNF- α	50
5.5.6.3	Níveis séricos de IL-1 β	51
5.5.6.4	Níveis séricos de IL-6	53
5.6	AVALIAÇÃO GENÉTICA	54
5.6.1	Extração do DNA	54
5.6.2	Genotipagem	55
5.6.2.1	Desenho dos primers para genotipagem	56

5.6.2.2 Genotipagem	56
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
6 RESULTADOS	58
6.1 DESCRIÇÃO DOS ANIMAIS INCLUÍDOS	58
6.2 VARIÁVEIS ANÁLISADAS	61
6.2.1 Frequência cardíaca	63
6.2.2 Tempo de preenchimento capilar	64
6.2.3 Pressão arterial sistólica	65
6.2.4 Pressão arterial diastólica	66
6.2.5 Frequência respiratória	67
6.2.6 Temperatura	68
6.2.7 Glicemia	69
6.2.8 Número de Hemácias	70
6.2.9 Hemoglobina	71
6.2.10 Hematócrito	72
6.2.11 Leucócitos	73
6.2.12 Plaquetas	74
6.2.13 Proteína total	75
6.2.14 Albumina	76
6.2.15 Alanina Aminotransferase	77
6.2.16 Fosfatase Alcalina	78
6.2.17 Ureia	79
6.2.18 Creatinina	80
6.2.19 Lactato	81
6.2.20 Potencial hidrogeniônico	83
6.2.21 Pressão parcial de oxigênio venoso	84
6.2.22 Pressão parcial de gás carbônico venoso	85
6.2.23 Bicarbonato	86
6.2.24 Saturação de oxigênio venosa	87
6.2.25 Excesso de base	88
6.2.26 Proteína C reativa	89
6.2.27 Fator de necrose tumoral alfa	90
6.2.28 Interleucina 1 beta	91

6.2.29	Interleucina 6	92
6.3	ANÁLISES GENÉTICAS	93
6.3.1	Análise do polimorfismo do TNF- α	93
6.3.2	Análise do polimorfismo da IL-1 β	93
6.3.3	Análise da associação entre os genótipos da IL-1 β e as dosagens	95
6.3.4	Análise da associação entre o genótipo e a gravidade da sepse	98
6.3.5	Análise da associação entre os genótipos da IL-1 β e os animais em sepse	102
6.3.6	Análise da associação entre os genótipos da IL-1 β e os animais em sepse grave	105
7	DISCUSSÃO	110
8	CONCLUSÃO	125
	REFERÊNCIAS	127
	APÊNDICE	136

1 INTRODUÇÃO

A piometra canina é uma infecção bacteriana que acomete o útero de cadelas sexualmente maduras e atinge aproximadamente 50% dos animais não castrados antes dos dez anos de idade. A infecção uterina, somada a resposta imune do hospedeiro gera a síndrome clínica conhecida como sepse e síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). Quando não tratada adequadamente ocorre a progressão da doença para estágios mais graves como a sepse grave, condição responsável pela disfunção de um ou mais órgãos e o choque séptico caracterizado por insuficiência circulatória aguda e hipotensão arterial não responsiva à reposição volêmica. Algumas condições influenciam diretamente a gravidade como a predisposição do hospedeiro, o tipo de insulto, a resposta do hospedeiro ao insulto infeccioso, o grau de resposta inflamatória do hospedeiro e a disfunção de órgãos que ocorre secundário à infecção. O adequado reconhecimento da gravidade do caso é fator determinante sobre a vida dos pacientes, no prognóstico, diminuição no tempo de internação e custo do tratamento. Tem-se demonstrado que a conduta terapêutica não deve ser baseada apenas em avaliações clínicas e rotineiras como a frequência cardíaca, pressão arterial, coloração de mucosas e débito urinário, sendo necessário obter variáveis de oxigenação e perfusão tecidual, provas de resposta inflamatória, lactato, bem como os níveis séricos dos biomarcadores da resposta inflamatória. A hipótese é que os cães apresentam mutações genéticas que alteram a produção de TNF- α e IL-1 β afetando de diferentes formas o metabolismo dos animais acometidos por infecção bacteriana. Para tal, um estudo que integre as avaliações clínicas e laboratoriais rotineiras à investigação dos polimorfismos genéticos do gene do TNF- α e da IL-1 β com os níveis plasmáticos de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e proteína C reativa no momento do diagnóstico da piometra em diferentes animais da espécie canina é de grande valia para a compreensão da doença e correta instituição da terapia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Através dos anos os seres vivos vem sofrendo de doenças causadas pelos microrganismos. Em circunstâncias normais, vários tipos de bactérias vivem coexistindo com os seres vivos. A pele, o trato digestivo, as vias respiratórias altas, os órgãos genito-urinários externos e a conjuntiva contêm bactérias comensais que não causam doenças ou ameaçam o organismo, pois estão conectados com o ambiente externo e estão separados do ambiente orgânico naturalmente estéril (VAN AMERSFOORT; VAN BERKE; KUIPER, 2003). As bactérias patogênicas e mesmo as comensais ou seus constituintes podem estimular a resposta imune se ultrapassarem a barreira entre o ambiente externo e interno. Após o reconhecimento da bactéria ou dos seus produtos, o organismo inicia o ataque, mata a bactéria e repara o dano causado. Esta sequência de eventos é altamente regulada, permitindo que o organismo possa combater a infecção por um ataque feito à medida que é agressivo o suficiente para erradicar a bactéria, mas não tão agressivo para causar danos desnecessários ao corpo (VAN AMERSFOORT; VAN BERKE; KUIPER, 2003).

Antes do início do século 20, relatos descrevendo outras infecções que não fossem causadas pela *Salmonella entérica* sorovar Typhi (febre tifoide) e a *Yersinia pestis* (peste negra) eram raras. A sepse e o choque séptico causados pelas bactérias gram-negativas e gram-positivas, fungos, vírus e parasitas começaram a ter a devida atenção durante as últimas décadas (GLAUSER et al., 1991).

A sepse é uma síndrome clínica heterogênea que pode variar de um estado auto limitante até uma reação desbalanceada do hospedeiro frente a uma infecção com consequências potencialmente letais (LEVY et al., 2010; GILLE-JOHNSON et al., 2012). Nos Estados Unidos, a taxa de sepse mais que dobrou entre 1979 e 1987, causando mais do que 250.000 mortes anualmente (OPAL; COHEN, 1999). Atualmente o crescimento anual americano de casos de sepse está em 8,7% o que representa um enorme fardo na saúde e na economia (MARTIN et al., 2003). Os casos fatais atingem entre 29 a 60% das pessoas acometidas e os gastos anuais estimados com o tratamento estão entre 16,7 e 24,3 bilhões de dólares somente nos Estados Unidos (ANGUS et al., 2001). No estudo de Taniguchi et al. (2014), e colaboradores entre 2002 e 2010 foram identificadas no Brasil aproximadamente 10 milhões de óbitos e esta taxa vem aumentando a cada ano. Na tentativa de diminuir as

internações e principalmente a taxa de mortalidade da sepse, foi criada, em 2002, a Campanha de Sobrevivência à Sepse, que contém recomendações para o manejo dos pacientes em sepse (DELLINGER et al., 2013). Porém, mesmo com todos os esforços, a mortalidade após o início da campanha declinou somente de 37% para 30% e os níveis permanecem altos e inaceitáveis. Durante o mesmo período, a incidência da sepse praticamente dobrou nos pacientes hospitalizados e é frequentemente reconhecida nos Departamentos de Emergência, sendo um problema com maiores proporções nos pacientes geriátricos (LEVY et al., 2010). A patogenicidade da sepse ainda não é bem conhecida e não existe tratamento específico, portanto o rápido reconhecimento, a correta avaliação clínica e laboratorial dos pacientes incluindo a análise dos biomarcadores da sepse, realizada de modo seriado tem papel importante no sucesso da terapia quando implementados de forma precoce (FAIX, 2013).

Em muitos casos de sepse, a presença de microorganismos (bacteremia) ou das endotoxinas (endotoxemia) no sangue não podem ser confirmados, o que gerou a modificação da definição de sepse e do choque séptico (VENET et al., 2000). As definições atualmente empregadas são: bacteremia, cultura sanguínea positiva para microorganismos; sepse, evidência clínica de infecção, taquicardia, taquipneia, hiper ou hipotermia; sepse grave ou síndrome sepse, sepse com hipóxia ou lactato plasmático elevado ou oligúria; e choque séptico, sepse grave com hipotensão persistente à reposição volêmica (VAN AMERSFOORT; VAN BERKE; KUIPER, 2003).

Na medicina veterinária, assim como nos seres humanos, a sepse está associada com índices altos de morbidade, sendo relatado de 20 a 68% de mortalidade. As condições de ocorrência natural que predispõe os cães à sepse incluem a parvovirose, peritonite, pancreatite, pneumonia, prostatite e a piometra (DE LAFORCADE et al., 2003). A piometra é caracterizada pela infecção bacteriana uterina de cadelas sexualmente maduras e ocasiona frequentemente a sepse. A infecção acomete mais de 50% dos animais antes dos dez anos de idade e principalmente animais de meia idade, entre 6 e 8 anos, porém existem relatos em animais de quatro meses até os 18 anos de idade (HAGMAN, 2012). Alguns fatores contribuem para o desenvolvimento, como período inter estro curto, a nuliparidade, bem como a administração de compostos hormonais derivados de estrógeno e progesterona (SUGIURA et al., 2004). Até o momento, foram identificadas algumas

raças que estão mais predispostas ao desenvolvimento da infecção, entre elas: Rottweiler, São Bernardo, Chow Chow, Golden Retriever, Schnauzer Miniatura, Airedale Terrier, Cavalier King Charles Spaniel e a Bernese Mountain Dog (PRETZER, 2008; HAGMAN et al., 2011; JITPEAN et al., 2012).

Geralmente a piometra ocorre no diestro, pois o útero apresenta as condições adequadas para o desenvolvimento fetal bem como para o crescimento bacteriano. O diagnóstico ocorre. Usualmente, no período de quatro semanas até quatro meses após o estro. No início da infecção ocorrem mudanças sutis e o diagnóstico muitas vezes é realizado nos estágios mais avançados da doença (SMITH, 2006; HAGMAN et al., 2009; HAGMAN, 2012).

Nos casos de diagnóstico tardio ou evolução rápida do quadro, a endotoxemia é uma consequência séria da infecção uterina, ocorrendo a progressão para a síndrome clínica conhecida como sepse e concomitante a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). A presença de SIRS pode ser detectada em mais de 50% das cadelas acometidas pela doença, o que piora a morbidade e prolonga o período de hospitalização (HAGMAN, 2012). Quando não tratada de forma adequada a sepse pode progredir para estágios mais graves como a sepse grave e o choque séptico (DE LAFORCADE et al., 2008).

Embora na medicina veterinária muitas das alterações ocasionadas pela infecção serem conhecidas, na prática o correto estadiamento da gravidade do quadro ainda é um obstáculo (BOLLER; OTTO, 2009).

2.1 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA PIOMETRA

A piometra apresenta sintomas no aparelho genital e sistêmicos, decorrentes da infecção do útero que pode estar com a cérvix aberta ou fechada, da endotoxemia e do processo inflamatório. O achado clínico mais comum em cadelas com piometra de cérvix aberta é o mau odor e secreção vaginal sanguinolenta ou mucopurulenta, porém pode estar ausente nos casos onde a cérvix está fechada. Os sintomas sistêmicos incluem a desidratação, inapetência, poliúria, polidipsia, distensão e dor abdominal, alteração do estado mental, vômito, diarreia, febre ou hipotermia, coloração anormal das mucosas, aumento das frequências cardíaca e

respiratória (PRETZER, 2008; HAGMAN, 2012). Geralmente os animais com cérvix aberta são sistemicamente menos comprometidos do que os animais com piometra de cérvix fechada e, como a afecção é detectada mais cedo, muitos animais não apresentam nenhum outro sintoma além do corrimento vaginal. Os animais com piometra de cérvix fechada geralmente apresentam o estado geral bem deteriorado, além dos sintomas descritos, depressão e letargia são evidentes, muitas vezes estão septicêmicas, toxêmicas e em choque. Esta condição caracteriza um quadro de emergência médica exigindo intervenção rápida para evitar a morte do paciente (SMITH, 2006; PRETZER, 2008; HAGMAN et al., 2009).

O diagnóstico da piometra canina é baseado no histórico, exame físico, análise hematológica e bioquímica, ultrassonografia e/ou radiografia abdominal e cultura ou citologia do corrimento vaginal. O tratamento mais seguro e eficaz quando o paciente está estável é a cirurgia de ovário-salping-histerectomia, que remove o local da infecção e evita a recidiva do quadro (SMITH, 2006; HAGMAN, 2012).

2.2 ACHADOS LABORATORIAIS

No exame citológico do corrimento vaginal, bactérias intra e extracelular podem ser observadas e os neutrófilos estão presentes em grande número (PRETZER, 2008).

No exame hematológico, a leucocitose com neutrofilia e desvio a esquerda na contagem diferencial de células brancas é frequente, a leucopenia pode ser encontrada e está associada a um prognóstico pior. A anemia normocítica normocrômica ocorre nos casos mais crônicos da doença pela diminuição do ferro disponível, perda dos eritrócitos para o útero e eritropoiese diminuída pela toxicidade na medula óssea que também pode gerar trombocitopenia. No exame bioquímico a hipoalbuminemia e hiperproteinemia são achados comuns, ocasionados pela perda de albumina pelos rins e aumento na produção de gamaglobulinas. O mal funcionamento dos rins é comumente observado na piometra e as concentrações de fosfatase alcalina, bilirrubina e colesterol elevadas

refletem uma provável colestase intrahepática. As alterações eletrolíticas e do equilíbrio ácido base também podem ocorrer (HAGMAN, 2012).

2.3 ETIOLOGIA E PATOGÊNESE

A infecção ocorre pela ascensão bacteriana da flora vaginal normal para o útero sensibilizado pela progesterona, que aumenta a atividade da glândula secretória e proliferação endometrial, diminui a contratilidade do miométrio e leva ao fechamento da cérvix. Estes efeitos são acumulados após repetidos ciclos estrais, o que explica a alta incidência em animais de meia idade e idosos (PRETZER, 2008; HAGMAN, 2012).

As mudanças hormonais que ocorrem durante o período estral aumentam o risco do desenvolvimento de piometra por gerarem alterações nos mecanismos imunológicos, via sistema imune inato. Esse sistema é a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores e possui entre os mecanismos, a fagocitose de patógenos e de células. Os neutrófilos são as células fagocitárias predominantes no sangue periférico e são os mais importantes componentes da imunidade inata. O processo de fagocitose pode ser separado em vários passos: quimiotaxia, acoplamento de partículas à superfície da célula fagocitária, fagocitose, morte intracelular oxigênio dependente (*burst* oxidativo) e mecanismos oxigênio independentes (HOLST et al., 2013).

O aumento da concentração de progesterona no início da fase luteal gera supressão da imunidade celular. A combinação da redução da imunidade local e as condições favoráveis para os patógenos fazem com que a colonização bacteriana ocorra nesta fase (PRETZER, 2008). O patógeno predominante em aproximadamente 70% dos casos é a *Escherichia coli*, estando a etiologia associada a certos fatores de virulência, incluindo a habilidade da bactéria em aderir a receptores específicos do endométrio (HAGMAN, 2012). No início da resposta imune padrões de reconhecimento e ligação de receptores aos microrganismos invasores resultam na indução e liberação sistêmica de citocinas. Essas proteínas apresentam papel central na coordenação do processo inflamatório e níveis aumentados podem ser encontrados na circulação após algumas horas do início da

infecção. A resposta anti-inflamatória é balanceada por mediadores como as interleucinas (IL) 10 (IL-10) e IL-1ra, que irão reprogramar as células brancas circulantes, reduzindo a capacidade dos monócitos de produzir citocinas pró-inflamatórias em resposta à endotoxina. Esta imunossupressão secundária pode levar ao comprometimento de funções imunológicas e agravamento do quadro (GILLE-JOHNSON et al., 2012).

Na piometra, a infecção bacteriana e as endotoxinas induzem uma resposta inflamatória do tecido uterino. Estudos voltados para os padrões moleculares constataram a expressão aumentada de mais de 800 genes no tecido uterino inflamado (HAGMAN et al., 2009). Muitos destes genes estão associados as quimioquinas, citocinas, extravasamento celular inflamatório, atividade antibacteriana, sistema complemento e resposta imune inata. Um número também elevado de genes apresentam expressão diminuída, incluindo homeobox e genes de zinco (HAGMAN, 2012).

A resposta imune inata, incluindo a habilidade fagocitária muda em diferentes condições fisiológicas. A resposta proliferativa das células mononucleares do sangue periférico à *E. coli* aumenta durante o proestro/estro e diminui a partir do décimo dia do diestro. Nos cães com sepse, a atividade fagocitária está aumentada enquanto o *burst* oxidativo diminuído (HOLST et al., 2013).

As endotoxinas são lipopolissacarídeos (LPS) encontrados na parede celular de bactérias gram negativas e são reconhecidas como padrões moleculares associados aos patógenos (PMAPs) (ULEVITCH; TOBIAS, 1999). As células com imunidade inata possuem receptores que reconhecem diferentes formas de PMAPs. Os receptores *Toll-like* (RTLs) e os receptores de lectina presentes na superfície celular reconhecem uma variedade de substâncias bacterianas no espaço extracelular. Os receptores de LPS são os primeiros RTLs encontrados em mamíferos; outros tipos de receptores no citoplasma reconhecem os peptidoglicanos bacterianos e/ou ácidos nucleicos (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011). Quando ativados por ligantes bacterianos, estes receptores estimulam os macrófagos a produzir o TNF- α , IL-1 β e IL-6. Estas três citocinas pró-inflamatórias produzem uma resposta inflamatória sistêmica que caracteriza o início da sepse. Desta forma, nos pacientes com sepse não são os microrganismos os responsáveis pelo quadro, mas a resposta imune (FAIX, 2013).

Estudos recentes têm demonstrado que existe mais na sepse do que somente uma resposta hiper-inflamatória exuberante (BALK, 2011). Tem sido observada a síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (SRAC), que segue a fase hiper-inflamatória principalmente nos pacientes que desenvolvem a sepse grave (BONE; GRODZIN; BALK, 1997). Durante a sepse grave a disfunção de órgãos está presente e pode incluir os rins, fígado, pulmões e alterações cognitivas. Nos quadros de choque séptico os pacientes apresentam colapso cardiovascular, estão irresponsivos a reanimação volêmica e terapia vasopressora, sendo o estágio final do quadro (FAIX, 2013).

A origem da falência de órgãos é desconhecida, mas se assemelha a síndrome da falência de múltiplos órgãos (SFMO) observada em pacientes que sobrevivem à lesão traumática grave (NI CHOILEAIN; REDMOND, 2006). A sepse e a SFMO pós-traumática representam a mesma resposta estereotípica imunológica a uma lesão grave. O paradigma é que o sistema imune inato inicialmente gera um estado pró-inflamatório em resposta aos PMAPs, ou no caso de lesão tecidual a resposta é a mesma para as moléculas chamadas de padrões moleculares associados ao dano (PMADs) derivados das células lesionadas do indivíduo (CHUNG; WATERER, 2011). Em muitos pacientes, a resposta pró-inflamatória é auto limitada, mas nos pacientes que desenvolvem sepse a resposta exagerada leva a uma regulação diminuída do sistema imune. Não está claro porque isto ocorre em alguns pacientes e em outros não, porém o maior risco parece estar ligado a uma disfunção pré existente do sistema imune. Os idosos que frequentemente apresentam algum grau de imunodeficiência ou pacientes imunossuprimidos possuem maior incidência de sepse, bem como maior taxa de mortalidade (FAIX, 2013).

O paradigma da patogenicidade da sepse envolve as diferentes abordagens terapêuticas que vem sendo testadas; diferentes biomarcadores estão sendo utilizados para o diagnóstico da sepse e monitoração do tratamento. As três citocinas proinflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) produzidas na SIRS, bem como a proteína C reativa (CRP), um membro bem estabelecido de um grupo de proteínas sintetizadas pelo fígado estimuladas pela IL-6, estão sendo investigadas como biomarcadores (FAIX, 2013).

2.4 BIOMARCADORES DA SEPSE

Segundo a Conferência Internacional para Definições da Sepse de 2001 o conceito de sepse está em evolução, partindo de observações clínicas, passando por alterações mensuráveis da fisiologia normal numa esfera macroscópica e celular, chegando finalmente no nível das organelas celulares (DE LAFORCADE et al., 2008).

Não existe um biomarcador ideal para a sepse, mas vários são de grande ajuda para a mínima identificação em pacientes críticos que necessitam de monitoração mais cuidadosa, precoce diagnóstico e tratamento (FAIX, 2013).

2.4.1 Citocinas pró-inflamatórias

O TNF- α , IL-1 β e IL-6 são as citocinas que induzem a resposta inicial pelo sistema imune inato frente a injúria ou infecção. O TNF- α e IL-1 β ambos ativam as células endoteliais, atraindo leucócitos polimorfonucleares (PMN) circulantes para o local da infecção. Quando entram na circulação, causam febre e outros sintomas sistêmicos. A IL-6 aumenta a produção hepática dos chamados reagentes de fase aguda, incluindo a CRP e estimula a mudança na produção de células pela medula óssea e mais PMN são produzidos. Portanto, estas citocinas são essenciais na resposta da SIRS e podem ser potencialmente utilizadas como biomarcadores da sepse (GHEZZI; CERAMI, 2005).

Das três citocinas pró-inflamatórias, a IL-6 tem recebido maior atenção. As mensurações plasmáticas podem ser realizadas com maior segurança do que as outras duas citocinas (BATFALSKY et al., 2012). Porém, assim como o TNF- α e IL-1 β , a IL-6 não é específica para a sepse e seu emprego como biomarcador da sepse pode ser interpretado como prognóstico e não diagnóstico. Estudos têm demonstrado que os aumentos nas concentrações de IL-6 nos pacientes com sepse está associado ao aumento na mortalidade (PATEL et al., 1994; PANACEK et al., 2004). A IL-6 apresenta um dos mais desejáveis atributos de um biomarcador ideal

para a sepse, porque é hábil em identificar nos pacientes com sepse qual apresenta risco aumentado para desenvolver sepse grave e portanto qual necessita de terapia suporte (ELIASSON; EGESTEN, 2008).

A SIRS é desencadeada quando ocorre liberação de endotoxinas por bactérias gram-positivas ou gram-negativas. Essas substâncias estimulam e ativam os monócitos e macrófagos que liberam o TNF- α e as ILs na tentativa de proteger o hospedeiro, porém a ativação excessiva da inflamação contribui para a falência de múltiplos órgãos e morte (DE LAFORCADE et al., 2008).

Os mediadores pró-inflamatórios promovem a disfunção das células endoteliais e comprometem o sistema cardiovascular bem como a homeostase intracelular. As células endoteliais apresentam importantes funções que envolvem a regulação do tônus vascular, a coagulação e a resposta imunológica. O endotélio produz os mediadores vasoativos como o óxido nítrico, as prostaciclina e as endotelinas que culminam em vasodilatação e hipóxia tecidual refratária a vasopressores como angiotensina II e noradrenalina (TAYLOR; GELLER, 2000; LANDRY; OLIVER, 2001)

A hipóxia tecidual aumenta o consumo de oxigênio nos tecidos, promovendo o aumento da demanda metabólica no organismo como um todo. Este desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio tecidual pode ainda ser agravado pela hipóxia citopática, na qual a célula apresenta dificuldade tanto em absorver o oxigênio, como também em utilizá-lo no processo de respiração celular corroborando no processo de disfunção dos órgãos (OUDEMANS-VAN STRAATEN et al., 1996; FINK, 2001).

Embora a inflamação sistêmica seja complexa, o TNF- α aparece como uma citocina central nos casos de sepse e SIRS, sendo o principal mediador da resposta inflamatória aguda e a única citocina capaz de induzir, de maneira isolada, a SIRS. A sua administração em indivíduos sadios reproduz essencialmente todos os efeitos deletérios das endotoxinas e bactérias, incluindo diminuição do débito cardíaco, hipotensão, ativação da cascata de coagulação e disfunção de órgãos (MIRA et al., 1999).

A mais de duas décadas, estudos têm demonstrado que o sistema imune dos pacientes em choque séptico sofre grande influência da presença de mutações ou polimorfismos genéticos (BLACKWELL; CHRISTMAN, 1996). Nos seres humanos, vários polimorfismos foram identificados nos genes promotores de TNF- α

e IL-1 β . Os polimorfismos estão intimamente relacionados com as proteínas de superfície dos monócitos e o aumento na produção de TNF- α e IL-1 β exercendo influência direta na gravidade do caso (STÜBER, 2001). Nos cães existem descrições dos polimorfismos relacionados com os genes do TNF- α e IL-1 β que aumentam a expressão e consequente produção destas substâncias, porém não existe nenhum relato comprovando ou correlacionando esta atividade genética (KIM et al., 1998; LINDBLAD-TOH et al., 2005).

O TNF- α promove adesão de células leucocitárias ao endotélio, liberando proteases e metabólitos da cadeia aracdônica, possuindo efeitos na modulação e expressão de outras citocinas. A febre, a neutrofilia, a anorexia, a sonolência e liberação da CRP são mediadas pela IL-1 β , além de induzir a liberação de conteúdo específico dos grânulos de neutrófilos humanos e a síntese de IL-6 pelos monócitos (CHRISTMAN; LANCASTER; BLACKWELL, 1998).

2.4.2 Proteína C reativa

A proteína C reativa (C-reactive protein – CRP) é provavelmente a mais utilizada em testes clínicos para o diagnóstico e tratamento da sepse, com exceção da avaliação sérica de lactato. A CRP é um biomarcador bem estabelecido da infecção e inflamação, faz parte de um grupo de reagentes de fase aguda produzidos pelo fígado que além de apresentarem um papel de apoio e aumentar a inflamação (sistema complemento), protege o paciente da injúria de inflamação tecidual (inibidores de proteases) (FAIX, 2013). O papel da CRP durante a inflamação aguda não está totalmente esclarecido; sabe-se que está envolvida na modulação da resposta do processo imune inflamatório e reparo de tecidos lesados. A CRP liga-se aos tecidos mortos ou lesionados, estimula a angiogênese, conecta-se a componentes de fosfolípidos dos microrganismos facilitando a fagocitose e remoção por macrófagos, sendo essencial para a cicatrização de feridas e o processo inflamatório crônico (DABROWSKI et al., 2009).

Como as concentrações de CRP aumentam de maneira significativa durante a inflamação aguda, o teste para detecção em seres humanos tem sido utilizado por

décadas para indicar a presença de doença inflamatória ou infecciosa (GABAY; KUSHNER, 1999). Em cadelas que apresentam complicações pós-operatórias, as concentrações de CRP persistem altas, indicando que o processo inflamatório é resultado da infecção da ferida cirúrgica (DABROWSKI et al., 2009). Embora apresente baixa especificidade, o que é uma desvantagem como biomarcador da sepse, é comumente utilizada para monitorar pacientes após cirurgias onde os níveis estão aumentados quando comparados ao período pré operatório, mas diminui a não ser que ocorra infecção pós-operatória (WELSCH et al., 2008).

Nos casos de piometra acompanhada por SIRS, os níveis séricos de CRP estão elevados e associados ao prognóstico e período de internação. A resposta inflamatória do procedimento cirúrgico eleva de forma transitória os níveis séricos de CRP, sendo a monitoração dos valores neste período uma ferramenta na detecção de complicações e da remissão da inflamação (HAGMAN, 2012).

2.4.3 Biomarcadores da disfunção de órgãos

Uma variedade de testes laboratoriais bem estabelecidos ajudam o veterinário a ter acesso a informações sobre disfunção de órgãos e a categorizar a gravidade do caso. Na medicina existem pontuações bem estabelecidas que classificam a condição do paciente, como o APACHE (*acute physiology and chronic health evaluation*) e a gravidade do caso (GARRABOU et al., 2012). Os níveis de bilirrubina e creatinina indicam disfunção hepática e renal, respectivamente. Porém, o biomarcador mais amplamente utilizado para disfunção de órgãos é o lactato sérico (FAIX, 2013).

A glicose é metabolizada anaerobicamente em piruvato e em muitos tecidos o piruvato é oxidado pela mitocôndria, mas na ausência de oxigenação tecidual adequada o metabolismo mitocondrial está comprometido (VOLPATO et al., 2012). Quando isto ocorre, as células vão produzir lactato a partir do piruvato para que ocorra a regeneração do co-fator dinucleotídeo adenina nicotinamida, necessário para que o metabolismo anaeróbico continue (GARRABOU et al., 2012). Comumente os níveis de lactato nos pacientes com sepse estão aumentados pela diminuição da perfusão tecidual, ocasionando hipóxia de órgãos e consequente

metabolismo anaeróbico (HAGMAN et al., 2009). A hiperlactatemia pode ser considerada como evidência de comprometimento vascular com injúria endotelial, coagulação intravascular ou hipotensão (FAIX, 2013).

O lactato é constantemente produzido pelas hemácias (que não possuem mitocôndria) e por tecidos com alta demanda metabólica, sem que exista comprometimento na perfusão. O fígado converte muito deste lactato novamente em glicose e oxida o restante. Desta forma, o comprometimento hepático causado pela sepse resulta em diminuição da eliminação do lactato e a inflamação sistêmica acaba induzindo ao aumento do metabolismo anaeróbico. O aumento do metabolismo pelo tecido lesado excede a capacidade oxidativa da mitocôndria, que por fim irá causar disfunção mitocondrial e contribuir para a hiperlactatemia (TOFFALETTI, 1991).

A baixa taxa de eliminação do lactato, monitorada com avaliações consecutivas no período de algumas horas está correlacionada com a elevação da CRP e tem sido utilizada como índice preditivo de mortalidade em seres humanos (HAGMAN et al., 2009).

3 HIPÓTESE

A sepse é motivo de estudo na medicina veterinária devido à elevada taxa de morbidade e de mortalidade. As análises rotineiras como a frequência cardíaca, pressão arterial, coloração de mucosas e débito urinário são de grande valia no atendimento dos animais com piometra, porém avaliações mais específicas do estado metabólico, como as variáveis de oxigenação, de perfusão tecidual, do lactato e a análise da resposta inflamatória do paciente pelos níveis séricos de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e de CRP podem servir para a correta caracterização da gravidade do caso e influenciar o prognóstico, o tempo de internação, o custo do tratamento e a sobrevida dos pacientes.

As informações sobre o perfil genético estão se tornando uma ferramenta extremamente valiosa para a compreensão do paciente em sepse. Provavelmente, os cães com piometra sofrem influência da informação genética que afeta diretamente a gravidade do caso, promovendo a resposta inflamatória pelo aumento da produção do TNF- α e da IL-1 β e conseqüentemente o animal acometido pela doença apresenta uma condição mais grave.

4 OBJETIVOS

- Avaliar a gravidade do caso, alterações sistêmicas e metabólicas do paciente no momento do diagnóstico.
- Avaliar a concentração plasmática de TNF- α , IL-1 β , IL6 e CRP no momento do diagnóstico.
- Correlacionar a condição clínica e metabólica do paciente com as concentrações de TNF- α , IL-1 β , IL6 e CRP.
- Avaliar a presença de polimorfismos na região decodificadora de TNF- α e IL-1 β em cadelas acometidas por piometra.
- Correlacionar a concentração plasmática de TNF- α , IL-1 β , IL6 e CRP com a gravidade do caso.
- Correlacionar os critérios de gravidade com as informações genéticas e inflamatórias das cadelas acometidas por piometra.

5 MATERIAL E MÉTODO

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - nº 2471/2011) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP).

5.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

Foram atendidas 253 cadelas no período de dezembro de 2012 a abril de 2014 no Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP. As concentrações de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e CRP foram realizadas no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP. A extração e análise do material genético foi realizada na Associação de Incentivo a Pesquisa - Molecular Core.

5.2 ANIMAIS

Foram utilizadas 94 cadelas adultas, com quadro clínico de piometra e foram submetidas ao tratamento cirúrgico de ovário-salpingo-histerectomia (OSH). Todos os proprietários assinaram o termo de consentimento esclarecido a respeito das intervenções que foram realizadas e sobre o projeto de pesquisa.

5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídas cadelas com piometra, afecção diagnosticada a partir do histórico e dos sinais clínicos identificados por meio do exame físico e ultrassonografia abdominal, com confirmação durante intervenção cirúrgica por meio

da detecção de distensão uterina em variados graus. As avaliações laboratoriais, hematológica e bioquímica corroboraram com a caracterização da gravidade da doença e inclusão dos animais em um dos quatro grupos estudados.

Os animais em que todas as coletas necessárias para a pesquisa não foram realizadas ou não foi possível manter o padrão das análises, que o proprietário optou pela eutanásia e que apresentavam doenças pré-existentes como neoplasias, diabetes, insuficiência renal e cardiomiopatia com utilização de terapia medicamentosa, não foram incluídos na pesquisa.

5.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Todos os parâmetros descritos para determinação do critério de inclusão foram avaliados na admissão. Neste momento as cadelas incluídas foram estratificadas em controle sem piometra e para a gravidade do caso em sepse, sepse grave ou choque séptico. A categorização dos animais em sepse é realizada quando à infecção acompanhada pela presença da SIRS (NGUYEN et al., 2006). A SIRS é definida como a presença de duas ou mais das seguintes características: a presença de mucosas congestas, temperatura retal menor que 38,1°C ou maior que 39,2°C, taquicardia (frequência cardíaca maior que 120 bpm), taquipneia (frequência respiratória maior que 20 movimentos respiratórios por minuto), alteração do nível de consciência, hipoalbuminemia, edema significativo, hiperglicemia na ausência de diabetes, número de leucócitos maior que 16.000/mm³ ou menor que 6.000/mm³ ou a presença de bastonetes maior que 3%.

A sepse grave é definida como a presença de SIRS e uma ou mais disfunção de órgãos. A disfunção de órgãos pode ser caracterizada pela lesão pulmonar (relação $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 100\text{mmHg}$) ou presença de pneumonia, trombocitopenia (contagem de plaquetas menor que 200.000 / μl), anemia (valor de hemoglobina menor que 12 g/dl), estado mental alterado, hipoperfusão com acidose láctica (níveis séricos de lactato superiores a 2,5 mmol/L), falência renal (níveis séricos de creatinina acima de 1,6 mg/dl), falência hepática (níveis séricos de fosfatase alcalina acima de 150 U/L), falência cardíaca ou arritmias.

O choque séptico é definido na presença de sepse grave e hipotensão refratária, caracterizada por pressão arterial sistólica (PAS) menor que 90 mmHg, pressão arterial média (PAM) menor que 65 mmHg ou a diminuição de 40 mmHg na PAS comparada ao valor inicial e irresponsiva ao aumento da fluidoterapia com cristalóide de 20 para 40 ml/kg.

5.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os exames clínicos e subsidiários como ultrassonografia abdominal, hemograma, prova de perfil bioquímico renal, hepático e resposta inflamatória, glicemia, lactatemia, hemogasometria, eletrocardiograma e pressão arterial não invasiva foram realizados com metodologias já validadas e empregadas de forma rotineira.

5.5.1 Pressão arterial

A mensuração das pressões arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) foi realizada com o paciente aparentemente tranquilo, ambientado à mesa e sala de atendimento. As avaliações foram executadas com o paciente em decúbito lateral direito por aparelho oscilométrico¹, os manguitos utilizados apresentavam largura com aproximadamente 40% do comprimento do membro torácico esquerdo. Foram executadas de três a cinco avaliações consecutivas e os valores utilizados foram os que estiveram mais próximos dentre as avaliações.

¹ petMAP, Ramsey Medical, Florida, Estados Unidos

5.5.2 Frequência cardíaca e respiratória

A frequência cardíaca foi aferida por meio da auscultação cardíaca precordial e a frequência respiratória por meio da observação dos movimentos torácicos no momento do atendimento.

5.5.3 Temperatura retal, tempo de perfusão e coloração de mucosas

A aferição da temperatura foi obtida por termômetro de mercúrio² graduado em graus Celsius inserido cerca de um centímetro no anus do paciente e direcionado para a parede retal durante 90 segundos.

Foi avaliada a coloração da mucosa ocular e gengival, o tempo de preenchimento capilar aferido por ligeira compressão da mucosa gengival até esta ficar branca e liberada a pressão. Foi considerado o tempo necessário para que a mucosa retornasse a coloração inicial.

5.5.4 Avaliação metabólica

A avaliação metabólica foi realizada por meio da coleta de sangue da veia jugular externa no momento do atendimento inicial em seringa contendo heparina³ e processada imediatamente após a coleta com analisador de gases e potencial hidrogeniônico (pH) sanguíneo³, do Serviço de Cirurgia do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP. Foi avaliada a pressão parcial de oxigênio venosa (PvO₂), a saturação venosa de oxigênio (SvO₂), o pH, o bicarbonato plasmático (HCO₃⁻) e o excesso de base. A lactatemia foi avaliada em aparelho portátil⁴ na sala de atendimento. Além da avaliação do lactato sistêmico no momento do atendimento

² Termômetro clínico, Incoterm, Porto Alegre, São Paulo, Brasil

³ ABL5, Radiometer, Copenhagen, Dinamarca

⁴ Accutrend lactate ® portátil, Roche, São Paulo, Brasil (Processo FAPESP 2006/57499-3)

inicial, em 29 animais no trans-operatório foi coletada nova amostra para analisar a quantidade de lactato sistêmico e foi coletada uma amostra de 0,1 ml de sangue da veia uterina. A amostra de sangue da veia uterina foi coletada pelo cirurgião no momento da exposição do útero e antes da ligadura. Os resultados da quantidade de lactato sistêmico foram comparados com a quantidade de lactato da veia uterina.

5.5.5 Hemograma, bioquímica renal e hepática

A realização do hemograma utilizou sangue armazenado em tubo contendo EDTA⁵; as bioquímicas renal e hepática foram analisadas pelos níveis séricos de ureia, creatinina, albumina, alanina aminotransferase, proteína total e fosfatase alcalina em tubo contendo ativador plaquetário e gel para separação de soro⁶. As amostras de sangue foram coletadas no momento do atendimento da veia jugular externa e as análises foram realizadas por meio das técnicas rotineiramente empregadas no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP.

5.5.6 Prova de resposta inflamatória

Foi coletado sangue da veia jugular externa no momento do atendimento em tubo contendo EDTA⁷. As amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 1000 x g e o soro obtido foi aliquoteado em microtubos tipo *ependorf*⁷ no Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento das análises no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP..

⁵ BD Vacutainer K2 EDTA 3,6mg, New Jersey, Estados Unidos

⁶ BD Vacutainer SSTTM II Advance, Plymouth, Reino Unido

⁷ Eppendorf 1,5 ml, Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil

5.5.6.1 Dosagem de proteína C reativa

Para as dosagens de proteína C reativa presente no soro foi utilizado método *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA⁸), seguindo rigorosamente as recomendações do fabricante.

O princípio de avaliação compreende o sanduíche de duplo anticorpo. Foram utilizadas placas de 96 poços e a CRP presente nas amostras reage com anticorpos anti-CRP que foram absorvidos pela superfície dos poços de microtitulação. Após remover as proteínas não ligadas por lavagem, os anticorpos anti-CRP conjugados com peroxidase foram adicionados. As enzimas rotuladas com anticorpos formam complexos com a CRP ligada previamente, após nova lavagem, a enzima ligada ao imunoabsorvente é adicionada ao ensaio com substrato cromogênico. A quantidade de enzima ligada varia diretamente com a concentração de CRP na amostra testada. Foi realizada a avaliação do conteúdo de cada poço com comprimento de onda em 450 nm⁹.

Às fileiras um e dois de cada placa foram adicionados os padrões, no poço 3A foi adicionado o controle e no restante dos poços as amostras (Figura 1). A figura 2 mostra a curva de calibração obtida as concentrações padrão.

As amostras que apresentaram níveis mais elevados do que a curva padrão foram diluídas e reanalisadas até que a concentração estivesse dentro da curva de análise.

Figura 1 - Representação gráfica demonstrando a placa de 96 poços para o teste ELISA da CRP com respectivos poços padrão (ng/ml), branco (BLK), controle (CTL) e amostras (SPL) – São Paulo – 2012/2014

CRP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200	200	CTL1	SPL8	SPL16	SPL24	SPL32	SPL40	SPL48	SPL56	SPL64	SPL72
B	100	100	SPL1	SPL9	SPL17	SPL25	SPL33	SPL41	SPL49	SPL57	SPL65	SPL73
C	50	50	SPL2	SPL10	SPL18	SPL26	SPL34	SPL42	SPL50	SPL58	SPL66	SPL74
D	25	25	SPL3	SPL11	SPL19	SPL27	SPL35	SPL43	SPL51	SPL59	SPL67	SPL75
E	12,5	12,5	SPL4	SPL12	SPL20	SPL28	SPL36	SPL44	SPL52	SPL60	SPL68	SPL76
F	6,25	6,25	SPL5	SPL13	SPL21	SPL29	SPL37	SPL45	SPL53	SPL61	SPL69	SPL77
G	3,125	3,125	SPL6	SPL14	SPL22	SPL30	SPL38	SPL46	SPL54	SPL62	SPL70	SPL78
H	BLK	BLK	SPL7	SPL15	SPL23	SPL31	SPL39	SPL47	SPL55	SPL63	SPL71	SPL79

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

⁸ Canine CRP ELISA kit, Innovative Research Inc, Michigan, Estados Unidos

⁹ Power Wave HT Microplate Spectrophotometer, Biotek, Vermont, Estados Unidos

Figura 2 - Representação gráfica demonstrando a curva de calibração das concentrações padrão da CRP – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

5.5.6.2 Níveis séricos de TNF- α

Para as dosagens de TNF- α foi utilizado o método *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA¹⁰), seguindo rigorosamente as recomendações do fabricante.

O princípio do ensaio emprega técnica enzimática de imunoensaio tipo sanduíche. Um anticorpo monoclonal específico para TNF- α de cão é pré-ligado a microplaca. Os padrões, controles e amostras são pipetados nos poços e qualquer TNF- α canino presente é ligado por anticorpo imobilizado. Após lavagem de qualquer substância que não tenha se ligado, um anticorpo policlonal específico para TNF- α ligado a enzima é adicionado aos poços. Após nova lavagem para remover qualquer reagente não ligado ao anticorpo, a solução de substrato é adicionada aos poços. A reação enzimática gera uma cor azulada que se transforma em amarelo quando a solução de parada é adicionada. A intensidade da cor mensurada é proporcional a quantidade de TNF- α presente na amostra. Foi realizada a avaliação do conteúdo de cada poço com comprimento de onda em 450 nm⁹.

Às fileiras um e dois de cada placa foram adicionados os padrões, no poço 3A foi adicionado o controle e no restante dos poços as amostras (Figura 3). A figura 4 mostra a curva de calibração obtida com as concentrações padrão.

¹⁰ Quantikine® ELISA Canine TNF- α , R&D System Inc, Minneapolis, Estados Unidos

Figura 3 - Representação gráfica demonstrando a placa de 96 poços para o teste ELISA do TNF- α com respectivos poços padrão (pg/ml), branco (BLK), controle (CTL) e amostras (SPL) – São Paulo – 2012/2014

TNF	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	500	500	CTL1	SPL8	SPL16	SPL24	SPL32	SPL40	SPL48	SPL56	SPL64	SPL72
B	250	250	SPL1	SPL9	SPL17	SPL25	SPL33	SPL41	SPL49	SPL57	SPL65	SPL73
C	125	125	SPL2	SPL10	SPL18	SPL26	SPL34	SPL42	SPL50	SPL58	SPL66	SPL74
D	62,5	62,5	SPL3	SPL11	SPL19	SPL27	SPL35	SPL43	SPL51	SPL59	SPL67	SPL75
E	31,2	31,2	SPL4	SPL12	SPL20	SPL28	SPL36	SPL44	SPL52	SPL60	SPL68	SPL76
F	15,6	15,6	SPL5	SPL13	SPL21	SPL29	SPL37	SPL45	SPL53	SPL61	SPL69	SPL77
G	7,8	7,8	SPL6	SPL14	SPL22	SPL30	SPL38	SPL46	SPL54	SPL62	SPL70	SPL78
H	BLK	BLK	SPL7	SPL15	SPL23	SPL31	SPL39	SPL47	SPL55	SPL63	SPL71	SPL79

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 4 - Representação gráfica demonstrando a curva de calibração das concentrações padrão do TNF- α – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

5.5.6.3 Níveis séricos de IL-1 β

Para as dosagens de IL-1 β foi utilizado o método *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA¹¹), seguindo rigorosamente as recomendações do fabricante.

O princípio do ensaio emprega técnica enzimática de imunoensaio tipo sanduíche. Um anticorpo monoclonal específico para IL-1 β de cão é pré-ligado a microplaca. Os padrões, controles e amostras são pipetados nos poços e qualquer IL-1 β canino presente é ligado por anticorpo imobilizado. Após lavagem de qualquer substância que não tenha se ligado, um anticorpo policlonal específico para IL-1 β

¹¹ Dog IL-1 β ELISA Kit, Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, Estados Unidos

ligado a enzima é adicionado aos poços. Após nova lavagem para remover qualquer reagente não ligado ao anticorpo, a solução de substrato é adicionada aos poços. A reação enzimática gera uma cor azulada que se transforma em amarelo quando a solução de parada é adicionada. A intensidade da cor mensurada é proporcional a quantidade de IL-1 β presente na amostra. Foi realizada a avaliação do conteúdo de cada poço com comprimento de onda em 450 nm⁹.

Às fileiras um e dois de cada placa foram adicionados os padrões e no restante dos poços as amostras (Figura 5). A figura 6 mostra a curva de calibração obtida com as concentrações padrão.

Figura 5 - Representação gráfica demonstrando a placa de 96 poços para o teste ELISA da IL-1 β com respectivos poços padrão (ng/ml), branco (BLK) e amostras (SPL) – São Paulo – 2012/2014

IL-1 β	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6	6	SPL1	SPL9	SPL17	SPL25	SPL33	SPL41	SPL49	SPL57	SPL65	SPL73
B	3	3	SPL2	SPL10	SPL18	SPL26	SPL34	SPL42	SPL50	SPL58	SPL66	SPL74
C	1,5	1,5	SPL3	SPL11	SPL19	SPL27	SPL35	SPL43	SPL51	SPL59	SPL67	SPL75
D	0,75	0,75	SPL4	SPL12	SPL20	SPL28	SPL36	SPL44	SPL52	SPL60	SPL68	SPL76
E	0,375	0,375	SPL5	SPL13	SPL21	SPL29	SPL37	SPL45	SPL53	SPL61	SPL69	SPL77
F	0,188	0,188	SPL6	SPL14	SPL22	SPL30	SPL38	SPL46	SPL54	SPL62	SPL70	SPL78
G	0,094	0,094	SPL7	SPL15	SPL23	SPL31	SPL39	SPL47	SPL55	SPL63	SPL71	SPL79
H	BLK	BLK	SPL8	SPL16	SPL24	SPL32	SPL40	SPL48	SPL56	SPL64	SPL72	SPL80

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 6 - Representação gráfica demonstrando a curva de calibração das concentrações padrão da IL-1 β – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

5.5.6.4 Níveis séricos de IL-6

Para as dosagens de IL-6 foi utilizado o método *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA¹²), seguindo rigorosamente as recomendações do fabricante.

O princípio do ensaio emprega técnica enzimática de imunoensaio tipo sanduíche. Um anticorpo monoclonal específico para IL-6 de cão é pré-ligado a microplaca. Os padrões, controles e amostras são pipetados nos poços e qualquer IL-6 canino presente é ligado por anticorpo imobilizado. Após lavagem de qualquer substância que não tenha se ligado, um anticorpo policlonal específico para IL-6 ligado a enzima é adicionado aos poços. Após nova lavagem para remover qualquer reagente não ligado ao anticorpo, a solução de substrato é adicionada aos poços. A reação enzimática gera uma cor azulada que se transforma em amarelo quando a solução de parada é adicionada. A intensidade da cor mensurada é proporcional a quantidade de IL-6 presente na amostra. Foi realizada a avaliação do conteúdo de cada poço com comprimento de onda em 450 nm⁹.

Às fileiras um e dois de cada placa foram adicionados os padrões e no restante dos poços as amostras (Figura 7). A figura 8 mostra a curva de calibração obtida com as concentrações padrão.

As amostras que apresentaram níveis mais elevados do que a curva padrão foram diluídas e reanalisadas até que a concentração estivesse dentro da curva de análise.

Figura 7 - Representação gráfica demonstrando a placa de 96 poços para o teste ELISA da IL-6 com respectivos poços padrão (pg/ml), branco (BLK) e amostras (SPL) – São Paulo – 2012/2014

IL-6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2000	2000	SPL1	SPL9	SPL17	SPL25	SPL33	SPL41	SPL49	SPL57	SPL65	SPL73
B	1000	1000	SPL2	SPL10	SPL18	SPL26	SPL34	SPL42	SPL50	SPL58	SPL66	SPL74
C	500	500	SPL3	SPL11	SPL19	SPL27	SPL35	SPL43	SPL51	SPL59	SPL67	SPL75
D	250	250	SPL4	SPL12	SPL20	SPL28	SPL36	SPL44	SPL52	SPL60	SPL68	SPL76
E	125	125	SPL5	SPL13	SPL21	SPL29	SPL37	SPL45	SPL53	SPL61	SPL69	SPL77
F	62,5	62,5	SPL6	SPL14	SPL22	SPL30	SPL38	SPL46	SPL54	SPL62	SPL70	SPL78
G	31,2	31,2	SPL7	SPL15	SPL23	SPL31	SPL39	SPL47	SPL55	SPL63	SPL71	SPL79
H	BLK	BLK	SPL8	SPL16	SPL24	SPL32	SPL40	SPL48	SPL56	SPL64	SPL72	SPL80

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

¹² Quantikine® ELISA Canine IL-6 R&D System Inc, Minneapolis, Estados Unidos

Figura 8 - Representação gráfica demonstrando a curva de calibração das concentrações padrão da IL-6 – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

5.6 AVALIAÇÃO GENÉTICA

5.6.1 Extração do DNA

A amostra do DNA foi obtida através da coleta de sangue da veia jugular externa em tubo contendo EDTA⁷ no momento do atendimento inicial. Imediatamente após a coleta, o sangue foi armazenado em temperatura inferior a -70°C, para a extração foi utilizada metodologia por coluna com o kit DNeasy¹³. O sistema tampão utilizado age lisando a célula e o DNA liga-se de forma seletiva a membrana, conforme protocolo do fabricante:

- Em tubo fornecido pelo fabricante foram misturados 20 µl de proteinase K em 100 µl de sangue e o volume foi ajustado para 220 µl com PBS.
- Em seguida foram adicionados 200 µl de tampão AL sem etanol a mistura que foi agitada e incubada por 10 min à 56°C.
- Após a incubação, foram misturados 200 µl de etanol 96% e foi realizada a agitação.
- A mistura foi pipetada, transferida para a coluna DNeasy e centrifugada a 6000 x g (8000 rpm) por um minuto. O líquido extraído foi descartado.

¹³ DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Texas, Estados Unidos

- A coluna foi transferida para um tubo de coleta de 2 ml fornecido pelo fabricante, foram adicionados 500 µl de tampão AW1 e o tubo foi centrifugado à 6000 x g (8000 rpm) por um minuto. O líquido extraído foi descartado.
- A coluna é transferida para um tubo de coleta de 2 ml fornecido pelo fabricante, foram adicionados 500 µl de tampão AW2 e centrifugado à 20000 x g (14000 rpm) por três minutos para secar a membrana. O líquido extraído foi descartado.
- A coluna é transferida para um tubo de coleta de 1,5 ml fornecido pelo fabricante, foram adicionados 200 µl de tampão AE à membrana e incubado em temperatura ambiente por um minuto. A mistura foi centrifugada por um minuto à 6000 x g para eluir, a amostra separada. Foi realizada nova eluição e as amostras foram armazenadas em duplicata à -80°.

A quantificação de DNA presente nas amostras foi realizada por espectrofotometria¹⁴ (medição A_{260}/A_{280}) (Apêndice A).

5.6.2 Genotipagem

O polimorfismo do TNF- α estudado foi o rs22216185 localizado no cromossomo 12 região 1074090, a sequência utilizada para gerar o arquivo foi:

TGGGGTCCAGTCTCCAGGGTCCTAC[A/C]CAATGTACNCAGCAGTGACTGGCCC

O polimorfismo da IL-1 β estudado foi o rs22530594 localizado no cromossomo 17 região 37024327, a sequência utilizada para gerar o arquivo foi:

AGCCATAATCTCAGGCAGAGAGGAA[A/G]GGAGAGAGGGAGAAAGAGACAGAC

¹⁴ NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Estados Unidos

5.6.2.1 Desenho dos primers para genotipagem

Tendo o gene definido, foi feito o desenho de pares de oligos iniciadores (*primers*) específicos. Para isso, a sequência do DNA foi resgatada em formato FASTA por meio do site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>. O desenho dos *primers* foi realizado com o auxílio do programa *file builder* desenvolvido pela *Life Technologies*, EUA que se encontra disponível pelo endereço <http://www6.appliedbiosystems.com/support/software/assaysbydesign/installs.cfm>.

A combinação de primers mais específica foi determinada pelo programa de comparação de sequências denominado *BLAST* (do inglês, Basic Local Alignment Search tool) que se encontra disponível pelo endereço www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Os primers foram sintetizados pela *Life Technologies* (Brasil).

5.6.2.2 Genotipagem

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada pelo método TaqMan®¹⁵, utilizando entre 1 e 20 ng de DNA por amostra. Foram adicionados 11,25 µl de amostra em cada poço da placa com 96 poços. A preparação da mistura para reação foi realizada em tubo de microcentrifuga com 12,5 µl de TaqMan® universal master mix¹⁶ e 1,25 µl da solução do ensaio de genotipagem do SNP¹⁷ por amostra. A seguir o tubo era invertido para realizar a mistura dos reagentes e centrifugado por 1 minuto para eliminar bolhas de ar. A seguir a mistura era adicionada aos poços da placa que continha o DNA. A placa era levada ao aparelho de *Real Time PCR*¹⁸ (RT-PCR) e submetida a 40 ciclos que alternavam entre desnaturação (15 seg a 92°C) e amplificação (1 min a 60°C). Após o término dos ciclos a sequência era analisada pelo software do sistema de detecção do RT-PCR, que utiliza a detecção da fluorescência durante a leitura da placa e os valores são baseados nos sinais

¹⁵ TaqMan®, Life Technologies, São Paulo, Brasil

¹⁶ TaqMan® universal master mix, Life Technologies, São Paulo, Brasil

¹⁷ Sonda customizada TaqMan®, Life Technologies, São Paulo, Brasil

¹⁸ 7500 Real-Time PCR system, Life Technologies, São Paulo, Brasil

provenientes de cada poço. As fluorescências são plotadas e os sinais indicam qual alelo está presente em cada amostra.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para testar a normalidade das variáveis quantitativas.

A análise dos resultados do exame físico, análise metabólica e da inflamação, obtidos nos diferentes tempos foram confrontados estatisticamente por meio de provas paramétricas. Foi utilizado o método de comparações múltiplas, para análise de variância com medidas repetidas (ANOVA).

Os testes estatísticos foram realizados no programa de computador GraphPad Prism¹⁹.

O teste do Qui Quadrado e Exato de Fisher foram utilizados para verificar a associação entre os genótipos e a gravidade da sepse. As análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS – Statistical Package for Social Sciences²⁰.

¹⁹ GraphPad Prism® 6, GraphPad Software Inc, California, Estados Unidos

²⁰ SPSS Statistics Desktop v.18.0, IBM Corporation, Nova Iorque, Estados Unidos

6 RESULTADOS

6.1 DESCRIÇÃO DOS ANIMAIS INCLUÍDOS

O atendimento dos pacientes teve início em novembro de 2012 e término em abril de 2014. Foram incluídos na pesquisa 94 animais, sendo que nove (9,57%) foram animais sem piometra e utilizados como controle, 23 (24,4%) estavam em sepse, 60 (63,82%) animais estavam em sepse grave e dois (2,12%) animais estavam em choque séptico.

Dos animais sem piometra cinco (55,5) eram sem raça definida (SRD), dois (22,2%) Maltês, um (11,1%) Labrador Retriever e um (11,1%) Golden Retriever. Os animais apresentaram idade de $6,8 \pm 2,4$ anos e peso de $14,7 \pm 11,34$ kg (Tabela 1 e Apêndice B).

Dos animais com piometra e em sepse, 12 (52,17%) eram SRD, quatro (17,39%) da raça Poodle, dois (8,69%) da raça Lhasa Apso, um (4,34%) da raça Boxer, um (4,34%) da raça Pit Bull, um (4,34%) da raça Akita, um (4,34%) da raça Schnauzer e um (4,34%) da raça Pastor Alemão. Os animais apresentaram idade de $10,1 \pm 3,7$ anos e peso de $14,9 \pm 9,1$ kg. Os sintomas mais comuns relatados foram o corrimento vaginal (100%), poliúria (69,5%), polidipsia (69,5%) e com início dos sintomas não excedendo uma semana (Tabela 1 e Apêndice B).

Dos animais que apresentavam piometra e estavam em sepse grave, 22 (27,27%) eram SRD, 12 (20%) Poodles, quatro (6,6%) Pinscher, quatro (6,6%) Pit Bull, três (5,0%) Rottweiler, três (5,0%) Golden Retriever, dois (3,3%) Labrador Retriever, dois (3,3%) Teckel, dois (3,3%) Fox Terrier, um (1,6%) Dálmata, um (1,6%) Schnauzer, um (1,6%) Dog Alemão, um (1,6%) Cocker Spaniel Inglês, um (1,6%) Pastor Branco e um (1,6%) Yorkshire Terrier. Os animais apresentaram idade de $9,8 \pm 2,7$ anos e peso de $14,9 \pm 12,1$ kg. Dentre os sintomas relatados o corrimento vaginal estava presente em 45 animais (75,0%), poliúria (91,6%), polidipsia (91,6%), hiporexia (55%), apatia (33,3%) e o início dos sintomas variou de uma a três semanas (Tabela 1 e Apêndice B).

Dois animais foram atendidos em choque séptico, sendo um SRD com 11 anos e seis quilos e um Pit Bull com 12 anos e 24 kg. Dentre os sintomas apresentados a

apatia era evidente em ambos, os proprietários relataram hiporexia e início dos sintomas há três semanas. Ambos os animais foram a óbito, sendo um antes do tratamento cirúrgico por hemorragia de via aérea superior e o outro 12 horas após a cirurgia por falência múltipla de órgãos (Tabela 1 e Apêndice B).

Tabela 1 – Idade (anos) e peso (kg) dos animais controle, com piometra em sepse, em sepse grave e em choque séptico no momento do atendimento – São Paulo – 2012/2014

	Idade (anos)					Peso (kg)			
	N	Média	DP	Min	Max	Média	DP	Min	Max
Controle	9	6,8	2	4	10	14,7	10,7	4	33
Sepse	23	10,1	3,7	1,6	16	14,8	9,1	4	37
Sepse Grave	60	9,8	2,7	3	16	14,1	12,3	2	52
Choque Séptico	2	11,5	0,7	11	12	15	12,7	6	24

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: N número, DP. desvio padrão, Min: mínimo, Max: máximo

O número de disfunções orgânicas dos 60 animais com sepse grave no atendimento inicial variou de um a oito, com média e desvio padrão de $4 \pm 1,47$. Das disfunções orgânicas mais frequentes, o nível sérico de lactato aumentado (igual ou maior que 2,5 mmol) foi observado em 51 (85%) animais, 29 (48,3%) apresentavam trombocitopenia, sendo que 12 (20%) apresentavam trombocitopenia leve [contagem de plaquetas (CP) entre $150 - 200 \times 10^3/\mu\text{L}$], seis (10%) trombocitopenia moderada (CP entre $100 - 149 \times 10^3/\mu\text{L}$) e 12 (20%) trombocitopenia grave (CP $< 100 \times 10^3/\mu\text{L}$). A anemia foi identificada em 23 (38,3%) animais, sendo 12 (20%) com anemia leve [hemoglobina (Hg) entre 9,0 e 11,0 g/dl], seis (10%) com anemia moderada (Hg entre 7,0 e 9,0 g/dl), três (5%) com anemia grave (Hg $< 7,0$ g/dl) e dois (3,3%) com anemia muito grave (Hg $< 4,0$ g/dl). Dentre outras alterações, a hipoalbuminemia (48,4%), uremia (56,6%), aumento da fosfatase alcalina (31,6%), diminuição da creatinina (20%), aumento da creatinina (15%), hipoglicemia (11,6%), hiperglicemia (13,3%), edema pulmonar (1,6%), pneumonia (1,6%), arritmias (1,6%) e mioclonias (1,6%) também foram observadas. Nos animais com sepse grave, que 25% dos animais estavam com piometra de cérvix fechada, 31,6% ficaram internados, 20% possuíam o útero rompido e 26,6% necessitaram de transfusão de sangue total ou hemoderivados (Figura 9 e Apêndice B).

Figura 9 – Representação gráfica demonstrando a variação das disfunções de órgãos das cadelas acometidas por piometra em sepse grave – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: Número de disfunção de órgãos dos pacientes em sepse grave

6.2 VARIÁVEIS ANALISADAS

As médias e respectivos desvios-padrão da média das variáveis analisadas no exame clínico, como a frequência cardíaca, o tempo de preenchimento capilar, a pressão arterial sistólica, a pressão arterial diastólica, a frequência respiratória, a temperatura e a glicemia; nos exames laboratoriais, como o número de hemácias, a concentração de hemoglobina, o hematócrito, o número de leucócitos, a contagem de plaquetas, a proteína total, a albumina, a alanina aminotransferase, a fosfatase alcalina, a ureia e a creatinina; na avaliação metabólica, como o lactato, o potencial hidrogeniônico, a pressão parcial de oxigênio venoso, a pressão parcial de gás carbônico venoso, o bicarbonato e o excesso de base; e da resposta inflamatória como a proteína C reativa, o fator de necrose tumoral alfa, a interleucina 1 β e 6 estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores médios e desvios-padrão da média das variáveis estudadas no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Variáveis	Gravidade			
	Controle	Sepse	Sepse Grave	Choque Séptico
FC	116,66 ±15,61	129,34 ±15,68	135,48 ±23,09	142,0 ±31,13
TPC	1,33 ±0,50	1,86 ±0,69	2,27 ±0,54	3,0 ±0
PAS	132,22 ±12,27	167,17 ±27,91	155,08 ±29,11	90,0 ±7,07
PAD	81,11 ±6,0	96,95 ±24,57	85,48 ±20,48	47,50 ±17,67
FR	33,77 ±2,90	45,90 ±9,40	43,67 ±9,42	52,0 ±11,31
Temperatura	37,73 ±0,37	38,51 ±0,54	38,64 ±0,69	36,75 ±0,91
Glicemia	85,44 ±5,38	87,86 ±12,31	90,25 ±26,5	141,50 ±75,66
Hemácias	6,56 ±0,59	5,92 ±0,56	5,28 ±1,35	4,75 ±1,06
Hemoglobina	14,11 ±0,92	12,61 ±0,97	11,51 ±2,99	10,45 ±1,9
Hematócrito	45,0 ±2,82	37,34 ±5,49	34,46 ±8,94	31,0 ±7,07
Leucócitos	9,02 ±0,93	26,46 ±11,52	38,98 ±26,56	62,05 ±6,43
Plaquetas	262,22 ±48,93	292,39 ±95,79	228,17 ±161,25	79 ±94,75
PT	7,02 ±0,19	7,18 ±0,61	6,99 ±1,02	6,35 ±2,47
Albumina	2,93 ±0,27	2,69 ±0,31	2,41 ±0,41	1,90 ±0
ALT	23,55 ±8,23	25,73 ±12,65	18,59 ±15,63	15,40 ±3,39
FA	54,33 ±26,0	87,64 ±42,6	142,97 ±134,97	414,20 ±411,25
Ureia	26,22 ±4,14	32,29 ±6,79	78,19 ±84,30	233,80 ±3,11
Creatinina	0,71 ±0,13	0,82 ±0,13	1,25 ±1,06	5,30 ±3,67
Lactato	1,86 ±0,21	2,50 ±0,53	3,59 ±1,16	3,70 ±1,83
pH	7,39 ±0,01	7,35 ±0,03	7,33 ±0,06	7,22 ±0,04
PvO ₂	54,0 ±8,33	47,33 ±10,68	48,63 ±15,01	40,25 ±8,80
PvCO ₂	38,66 ±3,30	33,77 ±6,10	34,37 ±9,23	37,30 ±2,40
HCO ₃	19,88 ±0,92	17,48 ±2,34	16,61 ±3,75	13,0 ±2,82
SvO ₂	79,66 ±5,22	62,32 ±10,77	63,76 ±13,82	64,80 ±11,03
BE	-0,22 ±0,44	-4,81 ±3,33	-6,71 ±3,94	-13,50 ±3,53
CRP	4,0 ±4,23	163,58 ±90,51	232,03 ±168,724	685,7 ±22,20
TNF- α	3,39 ±7,90	3,69 ±6,24	4,31 ±9,07	7,92 ±8,59
IL-1 β	0,60 ±1,18	1,33 ±1,55	2,54 ±2,32	3,41 ±3,09
IL-6	0 ±0	47,63 ±44,34	195,19 ±280,90	1027,48 ±56,72

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: frequência cardíaca (FC - batimentos por minuto), tempo de preenchimento capilar (TPC – segundos), pressão arterial sistólica (PAS - mmHg), pressão arterial diastólica (PAS – mmHg), frequência respiratória (FR - movimentos por minuto), temperatura (°C - graus Celsius), glicemia (mg/dl), hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), hemoglobina (g/dl), hematócrito (%), leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$), proteína total (g/dl), albumina (g/dl), alanina aminotransferase (ALT - U/L), fosfatase alcalina (FA - U/L), ureia (mg/dl), creatinina (mg/dl), lactato (mmol/L), potencial hidrogeniônico (pH), pressão parcial de oxigênio no sangue venoso (PvO₂ – mmHg), pressão parcial de gás carbônico no sangue venoso (PvCO₂ – mmHg), bicarbonato (HCO₃), saturação venosa de oxigênio (SvO₂ - %), excesso de base (BE), proteína C reativa (CRP - ng/ml), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α - pg/ml), interleucina 1 beta (IL-1 β - ng/ml), interleucina 6 (IL-6 - pg/ml)

6.2.1 Frequência Cardíaca (FC)

A análise da FC não apresentou variação significativa entre os grupos (Figura 10, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 10 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da frequência cardíaca (batimentos por minuto) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

6.2.2 Tempo de Preenchimento Capilar (TPC)

Os valores do TPC foram maiores nos animais em sepse grave e choque séptico quando comparados aos animais controle e em sepse (Figura 11, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 11 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do tempo de preenchimento capilar no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ controle e sepse menor do que sepse grave e choque séptico)

6.2.3 Pressão Arterial Sistólica (PAS)

O grupo controle apresentou PAS menor com diferença significativa quando comparado ao grupo sepse e o grupo choque séptico apresentou PAS menor com diferença significativa quando comparado aos grupos sepse e sepse grave (Figura 12, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 12 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da pressão arterial sistólica (milímetros de mercúrio) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ controle menor do que sepse; # $p < 0,05$ choque séptico menor do que sepse e sepse grave)

6.2.4 Pressão Arterial Diastólica (PAD)

O grupo sepse apresentou PAD maior com diferença significativa quando comparado ao grupo choque séptico (Figura 13, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 13 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da pressão arterial diastólica (milímetros de mercúrio) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ sepse maior do que choque séptico)

6.2.5 Frequência Respiratória (FR)

O grupo controle apresentou FR menor com diferença significativa quando comparado ao grupo sepse, sepse grave e choque séptico (Figura 14, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 14 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da frequência respiratória (movimentos por minutos) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ controle menor do que sepse, sepse grave e choque séptico)

6.2.6 Temperatura

Os grupos sepse e sepse grave apresentaram temperatura superior com diferença significativa quando comparados aos grupos controle e choque séptico (Figura 15, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 15 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da temperatura (graus Celsius) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ sepse e sepse grave maior do que controle e choque séptico)

6.2.7 Glicemia

O grupo choque séptico apresentou valores glicêmicos superiores com diferença significativa quando comparado ao grupo controle, sepse e sepse grave (Figura 16, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 16 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da glicemia (miligramas por decilitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ choque séptico maior do que controle, sepse e sepse grave)

6.2.8 Número de Hemácias

O grupo controle apresentou maior número de hemácias com diferença significativa quando comparado ao grupo sepse grave. (Figura 17, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 17 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do número de hemácias no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ controle maior do que sepse grave)

6.2.9 Hemoglobina

O grupo controle apresentou maior quantidade de hemoglobina com diferença significativa quando comparado ao grupo sepse grave. (Figura 18, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 18 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão quantidade de hemoglobina (gramas por decilitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ controle maior do que sepse grave)

6.2.10 Hematócrito

O grupo controle apresentou maior hematócrito com diferença significativa quando comparado ao grupo sepse grave. (Figura 19, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 19 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do hematócrito no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ controle maior do que sepse grave)

6.2.11 Leucócitos

O grupo controle apresentou contagem leucocitária significativamente menor do que os grupos sepse grave e choque séptico (Figura 20, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 20 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da contagem de leucócitos no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ controle menor do que sepse grave e choque séptico)

6.2.12 Plaquetas

Não foram observadas diferenças significativas na contagem plaquetária entre os grupos (Figura 21, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 21 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão na contagem de plaquetas no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

6.2.13 Proteína Total (PT)

Não foram observadas diferenças significativas na concentração de PT entre os grupos (Figura 22, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 22 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão de proteína total (gramas por decilitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

6.2.14 Albumina

A análise dos valores de albumina apresentou valores maiores para os grupos controle e sepse quando comparados aos grupos sepse grave e choque séptico (Figura 23, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 23 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão de albumina (gramas por decilitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ controle e sepse maior do que sepse grave e choque séptico)

6.2.15 Alanina Aminotransferase (ALT)

A análise dos valores de ALT não apresentou diferenças entre os grupos estudados (Figura 24, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 24 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da alanina aminotransferase (unidades por litro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

6.2.16 Fosfatase Alcalina (FA)

Os animais em choque séptico apresentaram valores maiores do que os animais controle, sepse e sepse grave (Figura 25, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 25 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da fosfatase alcalina (unidades por litro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ choque séptico maior do que controle, sepse e sepse grave)

6.2.17 Ureia

Os animais em choque séptico apresentaram valores de ureia significativamente maiores do que os animais controle, em sepse e em sepse grave (Figura 26, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 26 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão de ureia (miligramas por decilitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ choque séptico maior do que controle, sepse e sepse grave)

6.2.18 Creatinina

Os animais em choque séptico apresentaram valores de creatinina significativamente maiores do que os animais controle, sepse e sepse grave (Figura 27, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 27 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão de creatinina (gramas por decilitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ choque séptico maior do que controle, sepse e sepse grave)

6.2.19 Lactato

Os animais em sepse grave apresentaram valores de lactato significativamente maiores do que os animais controle e em sepse (Figura 28, Tabela 2 e Apêndice B).

Os valores de lactato coletado da veia uterina foram significativamente maiores do que os valores do lactato sistêmico coletado no trans-operatório (Figura 29, Tabela 3 e Apêndice C)..

Figura 28 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do lactato (milimol por litro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ sepse grave maior do que controle e sepse)

Tabela 3 – Valores médios e desvios-padrão da média da quantidade de lactato sistêmico coletado no trans-operatório e da quantidade de lactato coletado da veia uterina das cadelas com piometra – São Paulo – 2012/2014

	Lactato	
	Sistêmico	Uterino
Média	3,27	4,98
DP	0,95	1,23

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 29 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do lactato sistêmico (milimol por litro) coletado no trans-operatório e do lactato coletado da veia uterina dos animais com piometra – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ lactato sistêmico menor do que o da veia uterina)

6.2.20 Potencial Hidrogeniônico (pH)

Os animais em choque séptico apresentaram valores de pH significativamente menores do que os animais controle, em sepse e em sepse grave. Os animais em sepse grave apresentaram valores de pH significativamente menores do que os animais controle (Figura 30, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 30 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do pH no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ controle maior do que sepse grave, # $p < 0,05$ choque séptico menor do que controle, sepse e sepse grave)

6.2.21 Pressão parcial de oxigênio venoso (PvO₂)

A análise dos valores da PvO₂ não apresentou diferença entre os grupos estudados (Figura 31, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 31 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da pressão parcial de oxigênio venoso (milímetros de mercúrio) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

6.2.22 Pressão parcial de gás carbônico venoso (PvCO₂)

A análise dos valores de PvCO₂ não apresentou diferença entre os grupos estudados (Figura 32, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 32 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da pressão parcial de gás carbônico venoso (milímetros de mercúrio) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

6.2.23 Bicarbonato (HCO_3)

Os animais controle apresentaram valores de bicarbonato significativamente maiores do que os animais em sepse grave e choque séptico (Figura 33, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 33 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do bicarbonato (miliequivalentes por litro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ controle maior do que sepse grave e choque séptico)

6.2.24 Saturação de oxigênio venosa (SvO₂)

Os animais controle apresentaram valores de SvO₂ significativamente maiores do que os animais em sepse e em sepse grave (Figura 34, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 34. Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da saturação de oxigênio venosa no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (*p<0,05 controle maior do que sepse e sepse grave)

6.2.25 Excesso de base (EB)

Os animais controle apresentaram valores de EB significativamente maiores do que os animais em sepse, sepse grave e choque séptico. Os animais em sepse apresentaram valores significativamente maiores do que os animais em choque séptico (Figura 35, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 35 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do excesso de base no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ controle maior do que sepse, sepse grave e choque séptico, #: $p < 0,05$ sepse maior do que choque séptico)

6.2.26 Proteína C reativa (CRP)

Os animais controle apresentaram valores de CRP significativamente menores do que os animais em sepse, sepse grave e choque séptico. Os animais em choque séptico apresentaram valores maiores do que os animais em sepse e sepse grave (Figura 36, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 36 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão de proteína C reativa (nanograma por mililitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ controle menor do que sepse, sepse grave e choque séptico, # $p < 0,05$ choque séptico maior do que sepse e sepse grave)

6.2.27 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

A análise dos valores do TNF- α não apresentou diferenças entre os grupos estudados (Figura 37, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 37 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α picograma por mililitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

6.2.28 Interleucina 1 β (IL-1 β)

A análise dos valores de IL-1 β não apresentou diferenças entre os grupos estudados (Figura 38, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 38 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da interleucina 1 beta (IL-1 β - nanograma por mililitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

6.2.29 Interleucina 6 (IL-6)

A análise dos valores de IL-6 demonstrou diferenças significativas entre todos os grupos estudado. Os animais do grupo controle não apresentaram concentrações detectáveis de IL-6, entre os grupos em que foi possível detectar a presença de IL-6 os animais em sepse apresentaram a menor concentração, os animais em sepse grave apresentaram concentrações intermediárias e os animais em choque séptico apresentaram as maiores concentrações (Figura 39, Tabela 2 e Apêndice B).

Figura 39 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão da interleucina 6 (picograma por mililitro) no atendimento inicial das cadelas controle sem piometra e das acometidas por piometra em sepse, sepse grave ou choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ diferente entre todos os grupos)

6.3 ANÁLISES GENÉTICAS

6.3.1 Análise dos polimorfismos do TNF- α

Todos os animais incluídos na pesquisa foram homozigotos AA para o gene do TNF- α , desta forma não foi possível correlacionar a presença de polimorfismos com a gravidade do caso e os níveis dosados de TNF- α , IL-1 β , IL-6, CRP, lactato e glicemia.

6.3.2 Análise dos polimorfismos da IL-1 β

A análise dos genótipos do polimorfismo referente ao gene da IL-1 β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade apresentou a frequência do alelo A de 39,36% e do alelo G de 60,64% (Figura 40 e Tabela 4).

Figura 40 - Representação gráfica demonstrando a frequência dos genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Tabela 4 - Frequência dos genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014

Genótipo IL-1 β	N	%
AA	20	21,3
GG	40	42,6
AG	34	36,2
Total	94	100

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

6.3.3 Análise da associação entre os genótipos da IL-1 β e as dosagens

Não foram encontradas diferenças significativas entre os genótipos referente ao polimorfismo do gene da IL-1 β e os níveis dosados de TNF- α , IL-1 β , IL-6, CRP, lactato e glicemia de maneira independente da gravidade (Figuras 41, 42, 43, 44, 45, 46 e Tabela 5).

Figura 41 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α - pg/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 42 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de interleucina 1 beta (IL-1 β - ng/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 43 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de interleucina 6 (IL-6 – pg/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 44 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de proteína c reativa (CRP – ng/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 45 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de lactato (mmol/L) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 46 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados da glicemia (mg/dl) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Tabela 5 - Associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β e os níveis dosados do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α - pg/ml), interleucina 1 beta (IL-1 β - ng/ml), interleucina 6 (IL-6 - pg/ml), proteína c reativa (CRP - ng/ml), lactato (mmol/L) e glicemia (mg/dl), de maneira independente da gravidade – São Paulo – 2012/2014

Variável	Genótipo IL-1β									χ²	p
	AA			GG			AG				
	N	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP		
TNF-α	7	6,72	9,11	16	14,10	12,44	16	7,35	7,38	3,772	0,15
IL-1β	19	2,46	2,21	39	2,13	2,12	32	1,88	2,29	1,69	0,43
IL-6	17	148,7	137,9	29	231,1	310,5	29	167,8	300,9	1,87	0,39
CRP	20	225,7	188	38	190	179	34	244,5	171,1	2,9	0,23
Lactato	20	3,19	0,87	40	3,1	1,37	34	3,3	1,07	1,61	0,45
Glicemia	20	90,75	17,96	40	91,55	28,43	34	87,76	25,65	0,43	0,81

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: DP: desvio padrão da média

6.3.4 Análise da associação entre o genótipo e a gravidade da sepse

Não foi encontrada associação significativa entre a gravidade da sepse e os genótipos referentes ao polimorfismo do gene da IL-1 β (Figuras 46, 47, 48, 49, Tabela 6 e Apêndice B)

Figura 47 - Representação gráfica demonstrando a frequência dos genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas controle incluídas na pesquisa – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 48 - Representação gráfica demonstrando a frequência dos genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra e em sepse incluídas na pesquisa – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 49 - Representação gráfica demonstrando a frequência dos genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra e em sepse grave incluídas na pesquisa – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 50 - Representação gráfica demonstrando a frequência dos genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra e em choque séptico incluídas na pesquisa – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Tabela 6 - Associação entre os genótipos do polimorfismo referente ao gene da IL-1 β e gravidade da sepse – São Paulo – 2012/2014

Gravidade	Genótipo IL-1 β				Total	χ^2	p	Fisher p
	AA	GG	AG					
Controle	N	2	7	0	9	8,747	0,188	0,097
	%	22,20%	77,80%	0,00%	100,00%			
Sepse	N	3	9	11	23			
	%	13,00%	39,10%	47,80%	100,00%			
Sepse grave	N	15	23	22	60			
	%	25,00%	38,30%	36,70%	100,00%			
Choque séptico	N	0	1	1	2			
	%	0,00%	50,00%	50,00%	100,00%			
Total	N	20	40	34	94			
	%	21,30%	42,60%	36,20%	100,00%			

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Devido à pequena quantidade de indivíduos em choque séptico, uma análise separada comparando apenas os animais controle, em sepse e em sepse grave foi realizada. Porém, mesmo após a exclusão da categoria choque séptico, não foi encontrada associação entre o genótipo e a gravidade (Figura 51 e Tabela 7).

Figura 51 - Representação gráfica demonstrando a frequência dos genótipos referente ao gene da IL-1 β e a gravidade da sepse, excluindo os animais em choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Tabela 7 - Associação entre os genótipos do polimorfismo referente ao gene da IL-1 β e a gravidade da sepse, excluindo os animais em choque séptico – São Paulo – 2012/2014

Gravidade	Genótipo IL-1 β			Total	χ^2	p	Fisher p
		AA	GG	AG			
Sepse grave	N	15	23	22	8,199	0,085	0,059
	%	25,00%	38,30%	36,70%			
Sepse	N	3	9	11			
	%	13,00%	39,10%	47,80%			
Controle	N	2	7	0			
	%	22,20%	77,80%	0,00%			
Total	N	20	39	33			
	%	21,70%	42,40%	35,90%			

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

6.3.5 Análise da associação entre os genótipos da IL-1 β e os animais em sepse

Devido à ausência de dados relacionados ao TNF- α não foi possível realizar as análises para esta variável.

Foi encontrado efeito significativo dos genótipos do gene da IL-1 β sobre os níveis de IL-1 β nas cadelas com piometra em sepse. Os animais com o genótipo GG apresentaram níveis de IL-1 β significativamente maiores do que os animais com o genótipo AG (Figura 52 e Tabela 8).

Não foi observado efeito significativo do genótipo do gene da IL-1 β sobre os níveis de IL-6, CRP, lactato e glicemia nas cadelas com piometra em sepse (Figuras 53, 54, 55, 56 e Tabela 8).

Figura 52 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de interleucina 1 beta (IL-1 β - ng/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: (* $p < 0,05$ concentração de IL-1 β maior no genótipo GG do que no AG)

Figura 53 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de interleucina 6 (IL-6 – pg/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 54 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de proteína C reativa (CRP – ng/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 55 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de lactato (mmol/L) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 56 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados da glicemia (mg/dl) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Tabela 8 - Média e desvio padrão da média dos níveis de interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), proteína C reativa (CRP), lactato e glicemia nas cadelas com piometra em sepse – São Paulo – 2012/2014

Genótipo		IL-1 β	IL-6	CRP	Lactato	Glicemia
IL-1 β		IL-1 β	IL-6	CRP	Lactato	Glicemia
AA	Média	0,513	75,06	151,1	2,56	89,67
	DP	0,104	40,93	92,07	0,25	9,29
GG	Média	2,394	74,85	160,3	2,33	93,78
	DP	0,675	46,01	79,96	0,5	11,39
AG	Média	0,599	50,46	165,7	2,69	84,45
	DP	0,499	41,24	102,1	0,51	17,26

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: DP: desvio padrão da média

6.3.6 Análise da associação entre os genótipos da IL-1 β e os animais em sepse grave

Não foi observado efeito significativo do genótipo do gene da IL-1 β sobre os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, CRP, lactato e glicemia nas cadelas com piometra em sepse grave (Figuras 57, 58, 59, 60, 61, 62, Tabela 9 e Apêndice B).

Figura 57 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α - pg/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse grave- São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 58 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de interleucina 1 beta (IL-1 β - ng/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse grave – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 59 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de interleucina 6 (IL-6 – pg/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse grave– São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 60 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de proteína C reativa (CRP – ng/ml) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse grave – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 61 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados de lactato (mmol/L) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse grave – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Figura 62 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão dos níveis dosados da glicemia (mg/dl) e a associação entre os genótipos referente ao gene da IL-1 β das cadelas com piometra em sepse grave – São Paulo – 2012/2014

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Tabela 9 - Média e desvio padrão da média dos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), proteína C reativa (CRP), lactato e glicemia nas cadelas com piometra em sepse grave – São Paulo – 2012/2014

Genótipo IL-1b		TNF-a	IL-1b	IL-6	CRP	Lactato	Glicemia
AA	Média	6,99	3	158,5	269,6	3,46	92,07
	DP	9,95	2,193	144	191,7	0,8	20,36
GG	Média	14,54	2,21	248,8	219,8	3,7	87,78
	DP	15,53	2,18	310,5	174,8	1,39	29,39
AG	Média	9,55	2,43	176	264,5	3,64	89,41
	DP	9,23	2,56	297	169,4	1,15	29,72

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: DP: desvio padrão da média

7 DISCUSSÃO

As doenças uterinas como a hiperplasia endometrial cística, hemometra, mucometra, hidrometra e piometra são comuns em países onde a castração de cadelas sadias não é geralmente praticada (ORTEGA-PACHECO et al., 2012; GIBSON et al., 2013). A hiperplasia endometrial cística ocorre pela proliferação das glândulas endometriais, hiperplasia do endométrio, formação de cistos e pode estar haver acúmulo de líquido no útero (HAGMAN, 2014). A hemometra é uma afecção mais rara e o conteúdo uterino é hemorrágico (BARRAND, 2009). A mucometra, hidrometra e piometra são afecções que ocorrem pelo acúmulo de líquido no útero e são diferenciadas pelo tipo de fluido presente. Na mucometra, o conteúdo uterino varia de sero-mucoso a mucoso, na hidrometra é seroso e na piometra ocorre acúmulo de material purulento ou hemopurulento (HAGMAN, 2014). A piometra é uma condição comum importante clinicamente; as consequências são potencialmente letais e os sintomas são de manifestação local e sistêmica (GIBSON et al, 2013; GIFFORD et al, 2014; HAGMAN, 2014).

A incidência exata de piometra dentro da população de cadelas é difícil de estabelecer devido à grande proporção de cadelas castradas dentro da população dos animais de estimação (GIBSON et al., 2013). Egenvall et al. (2001) relataram uma incidência de piometra anual global de dois por cento a partir de um estudo com aproximadamente 200.000 cadelas predominantemente não-castradas. Jitpean et al. (2014), em um ano, diagnosticaram 356 animais com piometra na Universidade Sueca de Ciências Agrícolas. Gibson et al. (2013), durante em seis anos em cinco hospitais diferentes no Reino Unido, diagnosticaram 1728 cadelas com piometra. Quando comparado aos seres humanos, a casuística é extremamente elevada, Chan et al. (2001) relatam que a afecção nos seres humanos é incomum, pois em seis anos de análise retrospectiva de seus atendimentos somente 29 casos foram identificados.

Dos 94 animais incluídos no trabalho, 85 apresentavam piometra e foram distribuídos na escala de sepse proposta pela literatura conforme a gravidade do quadro. A sepse é alvo de constante investigação nos seres humanos e na medicina veterinária, devido à importante repercussão sobre a morbidade e mortalidade. Quando os resultados são analisados e compara-se com a literatura existente sobre

a sepse, percebe-se que a categorização da gravidade do caso é pouco abrangente bem como pouco específica. No grupo sepse grave observou-se ampla variação na quantidade de disfunções orgânicas, bem como na gravidade destas disfunções, fazendo com que os pacientes nesta condição apresentassem graus variáveis de morbidade. Segundo a literatura consultada, animais com SIRS e uma disfunção orgânica são classificados em sepse grave, a mesma que os animais com oito disfunções orgânicas (HAGMAN, 2014). Assim como, animais com anemia ou trombocitopenia leve também estão em sepse grave, a mesma dos animais com essas disfunções, porém mais importantes. Quando excluídos os animais controle, verificou-se que 70,58% dos animais atendidos estão em sepse grave e esta categoria da gravidade apresenta grande variação nas alterações orgânicas que necessitam ser descritas, graduadas, subdivididas e padronizadas para os animais com piometra.

A avaliação da frequência cardíaca não demonstrou diferenças significativas entre os grupos; nos animais controle, o estresse gerado pelas alterações na rotina do paciente que ocorrem no dia da cirurgia, como o jejum alimentar e hídrico, o ambiente do hospital veterinário apesar de ser um local calmo apresenta estímulos olfativos, auditivos e visuais, o veterinário responsável pelo exame é um estranho que manipula o paciente para aquisição dos parâmetros fisiológicos, levam o animal a certo grau de estresse e a frequência cardíaca fica mais elevada. Porém, no momento do atendimento a frequência cardíaca está elevada para os animais em sepse, sepse grave e choque séptico devido aos mecanismos orgânicos compensatórios à infecção. Um dos mecanismos é a maior ativação do sistema neurovegetativo simpático, que para manter o débito cardíaco aumenta a frequência cardíaca e para manter a perfusão aumenta a pressão arterial.

A diferenciação dos mecanismos envolvidos na frequência cardíaca pode ser realizada por meio da avaliação conjunta dos parâmetros cardiovasculares. Os animais controle e em sepse apresentaram valores menores de TPC quando comparados aos animais em sepse grave e choque séptico devido à vasodilatação capilar ocasionada pela SIRS. A ativação compensatória do sistema simpático nos animais em sepse e sepse grave foi eficiente para manter os valores da pressão arterial dentro dos valores normais, porém os mecanismos não são eficazes nos animais em choque séptico devido à gravidade da SIRS.

Os animais em choque séptico apresentaram menor temperatura e valores glicêmicos superiores em relação aos animais em sepse e sepse grave. Na resposta aguda ao estresse importantes fatores levam à hiperglicemia; a estimulação neuroendócrina eleva os níveis de glucagon, catecolaminas, glicocorticoides e das citocinas pró-inflamatórias (PISARCHIK et al., 2012). A produção dos mediadores provocam alterações patológicas em órgãos e sistemas vitais, incluindo alterações metabólicas. Uma das alterações metabólicas é a hiperglicemia resultante da glicólise muscular e lipólise, e subsequente gliconeogênese e glicólise no fígado. A hiperglicemia na doença crítica, como a sepse grave, não é apenas um marcador da gravidade da doença e indicador de mau prognóstico, mas também acarreta muitos efeitos adversos. Uma das consequências é o prejuízo da capacidade do sistema imune inato do hospedeiro para combater a infecção, apesar da acelerada diapedese dos leucócitos nos tecidos periféricos ocorre diminuição da atividade de quimiotaxia, formação de espécies reativas de oxigênio e fagocitose das bactérias pelos neutrófilos. Os padrões das citocinas sofrem alterações específicas, ocorre aumento das concentrações do TNF- α e IL-6 que são citocinas pró-inflamatórias precoces e uma redução de formação de óxido nítrico endotelial. Recentemente, foi descrito que a variabilidade da glicemia está associada com a mortalidade hospitalar em pacientes com sepse (ALI et al, 2008; WAESCHLE et al 2008) e que a gravidade da sepse exerce importante efeito sobre a glicemia (LEVY, 2006).

Outra característica de mudança metabólica na sepse é a hiperlactatemia devido à glicólise no músculo causada pelos hormônios e citocinas (HIRASAWA, 2009). No estudo em tela, os animais com sepse grave apresentaram a hiperlactatemia como disfunção orgânica mais comum, presente em 51 animais dos 60 incluídos neste grupo. Outro fator que contribui para o aumento do lactato é a hipoperfusão tecidual e consequente metabolismo anaeróbico, porém alguns animais em sepse grave e com níveis elevados de lactato apresentavam boa condição física. Esta associação nos fez perceber que a concentração de lactato não refletia a real condição do paciente, visto que em alguns casos foi coletado sangue da veia uterina e analisado o lactato que estava pelo menos 1,0 mmol e até 3,0 mmol a mais do que o lactato coletado da circulação sistêmica. Este fato demonstra que durante o curso da piometra e nos pacientes com menor gravidade o aumento do lactato sistêmico reflete principalmente o comprometimento do metabolismo tecidual uterino e não os efeitos sistêmicos da SIRS.

Na piometra, o grau das alterações sistêmicas é refletido em alterações hematológicas e bioquímicas mais ou menos grave. A liberação de endotoxinas associada com o processo inflamatório acarreta alterações da medula óssea e anemia normocítica normocrômica, trombocitopenia, leucocitose com neutrofilia e desvio a esquerda são muitas vezes observadas, porém, ocasionalmente a leucopenia pode estar presente (JITPEAN et al., 2014; HAGMAN, 2014). Os animais incluídos na pesquisa apresentaram uma correlação negativa da gravidade do quadro com o número de hemácias, hematócrito e quantidade de hemoglobina, ficando evidente que quanto maior a gravidade do quadro maior o efeito negativo sobre a medula óssea. A anemia, de leve a muito grave, e a leucocitose foram frequentemente evidenciadas em respectivamente 51,76% e 80% dos animais com piometra.

Os granulócitos, especialmente os neutrófilos, são produzidos a partir das células mielóides na medula óssea e desempenham papéis centrais na resposta imune inata contra a infecção bacteriana e fúngica. Normalmente, apenas neutrófilos totalmente diferenciados são liberados a partir da medula óssea para a circulação periférica, mas durante a inflamação neutrófilos imaturos são liberados para a periferia. Esta liberação não eleva apenas o número de neutrófilos no sangue periférico, mas também ocasiona diminuição do número de células na medula óssea, o que conduz a imunossupressão (LIVINGSTON et al., 2003). Na sepse, os neutrófilos são ativados e um grande número é liberado para o sangue periférico; no entanto, alguns pacientes em estado grave mostram apenas um pequeno número de neutrófilos. A leucopenia pode ser causada por depressão da medula óssea induzida pelas endotoxinas, em combinação com a inflamação crônica e perda de leucócitos para o lúmen uterino (JITPEAN et al., 2014). Portanto, as definições de SIRS incluem a contagem de células brancas no hemograma menor do que 4000/mm³ e maior do que 12.000/mm³ (STANDAGE, 2011). Os animais em sepse grave e choque séptico apresentaram contagem leucocitária maior do que os animais controle no momento do atendimento. Porém, 12 animais em sepse grave e com disfunções importantes de órgãos apresentaram contagem leucocitária normal, demonstrando o estado de imunossupressão e a transição entre a leucocitose e a leucopenia.

A contagem de neutrófilos pode variar nos animais em sepse independente da gravidade, porém um grande número de neutrófilos indica hiperinflamação, assim

como um pequeno número de neutrófilos indica imunossupressão e pacientes em estado crítico podem apresentar elevada ou baixa contagem neutrofilica. (UEDA et al., 2014). De acordo com Jitpean et al. (2014), os animais leucopênicos apresentam três vezes mais risco de ter hospitalização prolongada em comparação com os que apresentam contagem leucocitária normal e risco 18 vezes maior de desenvolver peritonite. Estes resultados fazem da leucopenia, o biomarcador clínico mais relevante. A contagem de células brancas dentro dos valores de referência foi associada com risco aumentado para hospitalização prolongada e peritonite comparada a leucocitose. Possivelmente isto ocorre devido aos valores serem a transição entre a leucocitose e leucopenia. A contagem de neutrófilos é difícil de ser usada para prever diretamente a gravidade do paciente. Vários relatos sugerem que o neutrófilo é um marcador útil de sepse (NAHM et al, 2008; PARK et al., 2011; FITROLAKI et al., 2013). No entanto, estes relatos focam em neutrófilos imaturos ou marcadores de superfície tais como CD64 (NAHM et al, 2008; PARK et al., 2011; FITROLAKI et al., 2013). Recentemente, verificou-se que as fêmeas toleram a sepse melhor do que os machos. O estudo realizado por Ueda et al. (2014) demonstrou que o risco de morte por sepse e choque séptico foi maior em homens do que nas mulheres. Além disso, Deitch et al. (2006) relataram que a testosterona aumenta a lesão no trauma ou na queimadura induzida por ativação de neutrófilos e o estrógeno atenua a ativação dos neutrófilos no trauma.

A inflamação crônica e as endotoxinas atuam sobre a medula óssea atingindo não somente os leucócitos, mas também os eritrócitos e plaquetas (JITPEAN et al., 2014). A trombocitopenia também foi frequentemente observada, sendo esse fato de extrema importância devido ao tratamento para a piometra ser cirúrgico, e a redução na contagem de plaquetas pode ser fator determinante no sucesso da terapia visto o risco aumentado de hemorragias. Mesmo o tratamento não ser o foco da pesquisa, vale ressaltar que o óbito em um dos animais em choque séptico ocorreu decorrente de epistaxe. Segundo as diretrizes da campanha internacional de sobrevivência à sepse, a classificação de choque séptico engloba o desafio hídrico com administração de solução salina intravenosa com objetivo de restaurar a pressão do paciente (DELLINGER et al., 2012). Durante a realização de tal procedimento, o animal apresentou taquipnéia súbita e piora acentuada do quadro, progredindo para parada cardio-respiratória. Durante as manobras de reanimação foi observada uma quantidade importante de sangue na região de

orofaringe originada das narinas. Com os resultados hematológicos em mãos, constatou-se que a paciente apresentava 12 mil plaquetas. Seguindo as diretrizes e na tentativa de salvar a vida da paciente é possível afirmar que a fluidoterapia administrada na tentativa de reverter o choque séptico ocasionou aumento da pressão arterial e maior diluição da contagem plaquetária, que gerou o sangramento e levou o paciente à óbito antes da intervenção cirúrgica.

A albumina é a principal proteína sintetizada pelo fígado e possui várias funções no organismo; é essencial para a manutenção da pressão oncótica normal no plasma e é a proteína responsável pelo transporte de várias substâncias na circulação, incluindo ácidos graxos, hormônios e medicamentos. A albumina apresenta também um efeito anti-trombótico e pode inibir a função das plaquetas, embora o mecanismos para essas ações ainda não estão claros (LYONS et al., 2010). Normalmente, a albumina tem uma meia-vida longa (15-19 dias), mas a albumina plasmática pode cair de 10 a 15 g/L em 3 a 5 dias nos pacientes graves (JELLINGE et al., 2014).

Dos animais com piometra, 32,94% apresentaram hipoalbuminemia; os animais controle apresentaram valores maiores do que os em sepse grave e choque séptico. A etiologia da hipoalbuminemia nesta configuração é multifatorial e pode refletir um estado nutricional pobre, em especial por inadequada ingestão de proteínas, ou mal-absorção de proteínas (KINOSHITA et al., 2014). A albumina é considerada uma "proteína de fase aguda negativa" com seus níveis reduzidos em processos inflamatórios agudos e também em condições inflamatórias crônicas (HERRMANN et al., 1992). A sepse promove o aumento do catabolismo proteico, da degradação da albumina e da permeabilidade vascular ocasionando o extravasamento de albumina vascular para o espaço extra vascular (LYONS et al., 2010).

A hipoalbuminemia tem sido associada com maior morbidade, com o aumento da mortalidade a curto prazo, com o tempo de internação e complicações (JELLINGE et al., 2014). Esta afirmação fica evidente nos animais do presente estudo, os dois animais em choque séptico que foram a óbito estavam com hipoalbuminemia e os animais com sepse grave também apresentaram valores inferiores quando comparados aos animais em sepse ou sem piometra.

Nos pacientes com sepse extra-hepática, foram descritos três padrões histológicos hepáticos. O mais comum é a colestase canalicular, que é mais grave

nas áreas perivenulares. O segundo padrão é de colestase ductular e inflamação, e o terceiro é a colangite não bacteriana, visto na síndrome do choque tóxico. Portanto, a sepse provoca colestase, colangite, ou ambos, no fígado e os testes da função hepática podem apresentar alterações que começam na fase inicial da sepse (KANAI et al., 2008). A colestase aumenta a síntese e liberação de FA, enquanto o acúmulo de sais biliares aumentam a sua libertação a partir da superfície de células do ducto biliar. Na sepse, alguns fatores além de colestase ou colangite, como as reações induzidas por medicamentos, podem induzir a atividade da enzima FA (KANAI et al., 2008). Na presente pesquisa, observou-se que os animais em choque séptico apresentaram valores de FA significativamente maiores do que os animais dos outros grupos e os valores da alanina aminotransferase não apresentaram diferenças entre os grupos. Estes achados corroboram com os achados de Kanai e colaboradores (2008), onde a elevação dos níveis séricos de FA no soro acompanhada por ligeiro ou nenhum aumento de ALT e bilirrubina pode ser um dos achados laboratoriais específicos que sugerem sepse.

A insuficiência renal aguda (IRA) é uma complicação comum na sepse e apresenta um prognóstico desfavorável. A mortalidade é maior em pacientes com IRA séptica (74,5%) do que naqueles cuja insuficiência renal não resultou de sepse (45,2%) (NEVEU et al., 1996). A fisiopatologia da IRA induzida pela sepse não é completamente conhecida. No entanto, sabe-se que esta forma de IRA tem componentes da lesão de isquemia-reperfusão, lesão inflamatória, coagulação e disfunção endotelial, e apoptose (MAJUMDAR, 2010). A piometra causa inflamação crônica do útero e consequente resposta inflamatória generalizada, com ativação das cascatas de coagulação e fibrinólise que resulta em lesão endotelial (MADDENS et al., 2011). A ampla gama de mediadores humorais liberados na circulação sistêmica, incluindo citocinas, mediadores lipídicos, como o fator ativador de plaquetas e metabólitos do ácido araquidônico, a endotelina-1, e componentes do complemento e a hipotensão sistêmica, resultam em diminuição do fluxo e consequente isquemia renal (DE VRIESE, 2003). A circulação intra-renal sofre vasoconstrição devido a um desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, que resulta na uma diminuição do fluxo sanguíneo renal (FSR) e desencadeia anormalidades na distribuição do fluxo sanguíneo intra-renal que predominantemente afeta a medula externa e muitas vezes é acompanhado por disfunção glomerular, tubular ou ambas (DE VRIESE, 2003; MADDENS et al.,

2011). As células inflamatórias podem infiltrar nos rins, causando dano local por libertação de radicais de oxigênio, proteases, e ainda pela produção de citocinas inflamatórias. A interação leucócito-endotélio resulta em congestão vascular medular e consequente diminuição do fluxo sanguíneo regional (DE VRIESE, 2003). A disfunção da coagulação e cascatas fibrinolíticas contribuem para a formação de trombos intra-glomerular. A lesão tubular leva ao desprendimento de células e consequente obstrução intra-tubular e fluxo retrogrado tubular. A recuperação da IRA requer a remoção das células necróticas tubulares e detritos, bem como da regeneração e reparação das células lesionadas (DE VRIESE, 2003).

Os marcadores da função renal utilizados na pesquisa demonstraram valores crescentes de acordo com a gravidade. Os valores séricos da ureia foram estatisticamente inferiores nos animais controle e com sepse quando comparados aos animais com sepse grave; os animais em choque séptico apresentaram os maiores valores. Os eventos cardiovasculares da sepse fazem com que os mecanismos renais, na tentativa de manter a volemia e adequada perfusão dos órgãos, reabsorvam sódio e a ureia junto ao sódio. Os valores de creatinina foram superiores nos animais em choque séptico quando comparados aos demais grupos, sendo o maior valor de 7,9 mg/dl. Porém, mesmo não apresentando diferença estatística entre os grupos, nove animais do grupo sepse grave apresentaram valores de creatinina maiores do que 1,6 mg/dl, sendo o maior valor de 6,7 mg/dl. Desta forma, do total de 85 animais com piometra, 11 apresentavam comprometimento da função renal e dois foram a óbito. A importância desses dados não recai somente sobre a gravidade e mortalidade dos pacientes, mas interfere diretamente no período de internação e no tempo necessário para o completo restabelecimento.

Devido a vários fatores limitantes à pesquisa não foi realizado o acompanhamento por maior tempo dos pacientes com alterações renais e não é possível fazer qualquer afirmação a respeito da sobrevida destes pacientes. De acordo com Maddens et al. (2011), a resolução da disfunção renal é alcançada na maioria dos animais com piometra variando de dias até meses após a cirurgia. Porém, no seu trabalho Maddens et al. (2001) relatam que 8% dos animais com piometra por *Escherichia coli* apresentaram insuficiência renal após o tratamento cirúrgico e 12% permaneceram com poliúria, polidipsia e proteinúria, e 5% morreram no estágio final da doença renal no prazo de três anos.

Nos seres humanos, a análise da gasometria arterial (GA) é comumente realizada para avaliação clínica, mas o processo tem certas limitações como a aceitação do paciente (uma vez que o procedimento pode ser doloroso) e o potencial de causar complicações como lesão arterial, trombose com isquemia distal, hemorragia, hematoma, formação de aneurisma, danos aos nervos medias e, raramente, distrofia simpática reflexa. Além disso, o procedimento apresenta risco, pequeno mas significativo, em deflagrar ferimentos por picada de agulha nas pessoas envolvidas na coleta do sangue (MALATESHA et al., 2007; TREGER et al., 2010). A análise dos gases no sangue venoso (GV) requer menor manipulação do animal, é um procedimento relativamente mais seguro para o paciente e para o profissional de saúde, e é uma alternativa para a análise da GA para o equilíbrio ácido-base. Estudos recentes tem demonstrado a correlação entre os valores da GA e da GV (MALATESHA et al., 2007; MIDDLETON et al., 2006). A análise da GV não substitui a análise da GA na determinação da pressão parcial arterial de oxigênio (PaO_2), e a punção arterial pode ser necessária para monitorização da pressão arterial invasiva, mas dada a boa precisão da oximetria de pulso, a análise da GV é uma alternativa mais segura do que a análise da GA para determinar o equilíbrio ácido-base e a pressão parcial venosa de gás carbônico (PvCO_2), reduzindo a necessidade de amostragem arterial invasiva (TREGER et al., 2010).

No presente estudo, inicialmente havia sido feita a opção de amostragem arterial para avaliação hemogasométrica. Porém, alguns fatores contribuíram para a alteração da coleta para GV. Entre eles, a aceitação dos pacientes dificultando a coleta; o consequente desconforto dos proprietários em ver o seu animal de estimação ser submetido à contenção e manipulação para coleta de sangue, sendo que o sangue venoso já havia sido coletado; o risco de complicações aumentado devido à inicial falta de hemograma e contagem de plaquetas; o estresse gerado nos pacientes mais graves e as publicações recentes correlacionando os valores da GA com a GV. Nos animais onde houve dúvida sobre a condição pulmonar, realizou-se a GA além da GV.

A avaliação da GV demonstrou que quanto maior a gravidade do quadro menor foram os valores do pH, bicarbonato e excesso de base; somado a esses achados, observou-se que quanto maior a gravidade, maior foi a frequência respiratória compensatória à acidose metabólica. A sepse causa inúmeras alterações fisiológicas, a acidose metabólica é um achado comum, mas o impacto na

morbidade e mortalidade depende da gravidade e da causa (MOVIAT et al., 2013; KELLUM, 2004). Enquanto a acidose pode ser o resultado da patofisiologia da sepse, pode também ser resultado da terapia empregada (KELLUM, 2004). A concentração de bicarbonato é usada para marcar a contribuição metabólica para o pH. A concentração total de dióxido de carbono é uma alternativa comum a o bicarbonato já que a maioria do dióxido de carbono no plasma apresenta-se sob a forma de bicarbonato (HOPPER, 2008). O estudo de Moviat et al. (2013) demonstrou a aplicação da equação de Stewart ao invés da equação de Henderson-Hasselbach para determinar o real estado metabólico do paciente, pela sua performance superior para diagnosticar e quantificar as desordens ácido base. A equação de Stewart leva em consideração três variáveis independentes para determinar o pH, sendo a PCO_2 , a diferença de íons fortes e o total de ácidos fracos, principalmente a albumina e o fosfato. O excesso de base (BE) é o marcador mais puro do componente metabólico, reflete o ácido forte ou base tituláveis necessários para restaurar o pH plasmático de 1 L de fluido extracelular com a hemoglobina totalmente oxigenada para 7,4 a uma PCO_2 de 40 mm Hg e uma temperatura de 37 °C. Os valores do BE são cerca de zero em humanos e cães, e são ligeiramente mais negativo em gatos. O BE negativo (um déficit de base) é indicativo de acidose metabólica enquanto o BE positivo indica alcalose metabólica (HOPPER, 2008).

O estudo de Noritomi et al. (2009) com a determinação do impacto das perturbações de íon gap, diferença de íon inorgânico, lactato, fosfato, e albumina no BE medido, demonstrou que o lactato de 2 mEq/L, quando comparado com um nível normal de 1 mEq/L, seria responsável por uma variação do BE em -1 mEq/L ou BE atribuível ao lactato igual a -1 mEq / L. Desta forma, os pacientes apresentaram como alteração mais frequente a hiperlactatemia que não corresponde necessariamente a uma condição de acidose láctica sistêmica, visto que os valores uterinos de lactato foram superiores ao circulante nos animais com piometra. O aumento do valor sérico de lactato, em muitos casos, é resultado do lactato uterino diluído na circulação. Somando todos estes fatores a real avaliação da condição metabólica do paciente com piometra deve ser revista.

Não existe um teste rápido e preciso para diagnosticar a sepse, razão pela qual certos critérios clínicos são usados para identificar os pacientes com maior probabilidade de apresentar sepse. Os critérios de diagnóstico clínico para sepse são semelhantes em cães e humanos, compreendendo as frequências cardíaca e

respiratória elevadas, contagem total de células brancas e temperatura anormais (HAUPTMAN et al., 1997). Estes critérios são muito inespecíficos e contribuem para o falso e atrasado diagnóstico da sepse, aumento da mortalidade e interferem na correta escolha do tratamento (HAUPTMAN et al., 1997). Desta forma, novos critérios ou marcadores que contribuam para o diagnóstico preciso da sepse tem sido intensamente pesquisados. Na medicina veterinária em especial nos cães, alguns biomarcadores foram avaliados para o diagnóstico e índice prognóstico da sepse e SIRS, incluindo a procalcitonina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 8 (IL-8), metabólito de prostaglandina $F_{2\alpha}$ indicador de endotoxina (PGM) e um marcador de inflamação bem estabelecido a proteína C reativa (CRP) (HAGMAN et al., 2006; FRANSSON et al., 2007; NAKAMURA et al., 2008; DECLUE et al., 2012; KARLSSON et al., 2012).

Atualmente, está bem estabelecido nos cães que o aumento da concentração de CRP no sangue está intimamente associado às condições inflamatórias. No entanto, a CRP não distingue a sepse de outras condições inflamatórias (KARLSSON et al., 2013). No presente estudo observou-se que as concentrações de CRP foram significativamente maiores nos animais com piometra. Além disso, quanto maior a gravidade do quadro maior foi a concentração de CRP. Estes achados demonstram uma boa correlação entre a gravidade do quadro e a concentração de CRP. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores em cães com piometra (FRANSSON et al., 2007). Um estudo com 307 cães com SIRS de causas infecciosas e não infecciosas demonstrou que as concentrações de CRP estiveram aumentadas no plasma de cães com SIRS (ISHIDA et al., 2011).

A CRP aumentada geralmente sugere infecção aguda ou processo inflamatório, enquanto que valores reduzidos de albumina estão mais frequentemente associados com doença crônica, muitas vezes ligada com deficiência nutricional. Nos seres humanos, estas análises estão prontamente disponíveis, geralmente em poucos minutos após a admissão, e muitas vezes são executados automaticamente como parte de um perfil de admissão. Atualmente nos seres humanos um escore prognóstico de inflamação baseado na relação CRP/albumina tem demonstrado maior especificidade e tem sido empregado clinicamente (KINOSHITA et al., 2014).

A ocorrência da piometra é mais comum na primeira metade do diestro, quando ocorre a diminuição da imunidade celular associada ao aumento da concentração sérica de progesterona. A progesterona nas cadelas apresenta uma atividade peculiar no sistema imune, modulando a ação dos linfócitos T, podendo suprimir a função destas células e afetar diretamente a imunidade local e favorecer a instalação da infecção uterina (SUGIURA et al., 2004; SMITH, 2006; MICHELON et al., 2006; DABROWSKI et al., 2007). A presença do patógeno no organismo promove a ativação do sistema imune inato, mediado pelos macrófagos e neutrófilos que reconhecem as moléculas do agente e levam à sinalização intracelular, ativação de fatores de transcrição e produção de citocinas (ROBERTSON; COOPERSMITH, 2006; DICKSON, 2009). As citocinas como o TNF- α , IL-1 β e IL-6 são proteínas solúveis sintetizadas por várias células do sistema imune e agem como reguladoras e induzem a produção de imunoglobulinas pelos plasmócitos, previnem a aderência e neutralizam as toxinas bacterianas (MACIEL et al, 2014).

O TNF- α e a IL-1 β não apresentaram diferenças entre os grupos estudados. Assim, como no estudo realizado por Maciel et al. (2014) que não observaram diferenças significativas entre os animais com piometra, gestantes, em anestro e diestro. No estudo realizado por Karlsson et al. (2012), que envolveu a avaliação das citocinas em cadelas sem piometra, com piometra sem SIRS e com SIRS, também não foram observadas diferenças entre os grupos.

O TNF- α e IL-1 β são produzidos principalmente como mediadores mais iniciais da cascata das citocinas. Nos seres humanos em sepse, as concentrações variam significativamente e não são detectados de forma consistente no soro (SONG et al., 2012). Provavelmente esta variação ocorre porque a produção é predominantemente local, a meia vida é curta e a existem inibidores circulantes (SONG et al., 2012). Assim como para o lactato, a coleta de sangue da veia uterina para análise da produção das citocinas pode ser realizado. Apesar da percepção de que o lactato sistêmico era resultado da diluição do lactato produzido pelo útero ocorrer com o andamento da pesquisa, foi possível comprovar que os valores de lactato na veia uterina foram superiores em relação aos valores séricos. Essa comprovação abre margem para inúmeras pesquisas ligadas não somente ao lactato, mas a expressão de genes dos agentes inflamatórios e anti-inflamatórios, bem como para o estudo da quantidade produzida no útero com piometra dessas

substâncias. É possível realizar a coleta de amostras da artéria uterina e comparar com o resultado da quantidade na veia uterina, fornecendo dessa forma a exata produção de substâncias pelo tecido uterino naturalmente afetado por infecção bacteriana. A divisão do tecido uterino nas regiões epigástrica, mesogástrica e hipogástrica pode fornecer dados mais detalhados sobre como a piometra afeta a circulação uterina e as consequências para o metabolismo do tecido uterino, sendo coletado sangue arterial e venoso em varias regiões da circulação uterina.

Uma complicação da piometra é a ruptura uterina, provavelmente esta complicação é decorrente das reações inflamatórias locais. Inicialmente, a infecção eleva substancialmente a produção dos mediadores inflamatórios e ocorre edema tecidual e acidose láctica. A pressão de perfusão capilar para que ocorram as trocas entre o sangue e o tecido é de 17 mmHg, com a cronificação do quadro estes eventos acometem a perfusão capilar, dificultando a circulação e prejudicando ainda mais o metabolismo, a remoção de substâncias e metabólitos. A diminuição da pressão de perfusão capilar associada ao processo inflamatório gera a formação de microtrombos, com consequente isquemia tecidual e ruptura uterina. A variação de tempo para que estes eventos ocorram provavelmente esta correlacionado com a patogenicidade bacteriana, assim quanto mais patogênica a bactéria e menos efetivas as defesas do hospedeiro mais rapidamente ocorrem as complicações.

Os macrófagos e os mastócitos, também produzem IL-6, importante ativador da resposta de fase aguda. A produção da IL-6 é estimulada pelas endotoxinas bacterianas, IL-1 β e TNF- α (NEMZEK et al., 2001). A IL-6 tem uma meia-vida mais longa no plasma de que o TNF- α ou a IL-1 β e a sua concentração é significativamente mais elevada no plasma de indivíduos em sepse (RAU et al., 2007). Assim, a IL-6 é um bom marcador da gravidade de uma infecção bacteriana sistêmica (RAU et al., 2007). Watanabe et al. (2005), percebendo a importância da IL-6 como um dos importantes mediadores da resposta precoce à sepse, introduziram recentemente um sistema de medição rápida da IL-6 no sangue. O sistema pode avaliar a concentração, após 30 minutos da coleta da amostra, e o resultado da análise tem sido utilizado para avaliar a gravidade do caso. Após a introdução deste sistema que fornece os resultados praticamente em tempo real, a avaliação da IL-6 pode ser empregada de forma rotineira em todos os pacientes na unidade de terapia intensiva. Entre os pacientes cujo nível de IL-6 no sangue foi

avaliado, ocasionalmente foram encontrados alguns pacientes que produziam citocinas excessivamente.

Os valores da IL-6 no momento do atendimento apresentaram diferenças muito significativas entre todos os grupos. Nos animais controle não foi detectada e ocorreu aumento significativo conforme a gravidade do caso. Desta forma, os valores de IL-6 possuem uma relação inversa com o prognóstico, quanto maior a concentração pior o prognóstico.

A avaliação da genotipagem do $TNF\alpha$ não encontrou nenhum animal com polimorfismo, sendo todos os animais incluídos no estudo homozigotos AA. No estudo de Watanabe et al. (2005) a avaliação de 150 seres humanos encontrou apenas 2 (1,3%) heterozigotos GA, sendo 148 (98,7%) homozigotos GG. No presente estudo não é possível afirmar sobre a presença de polimorfismos ligados ao $TNF\alpha$, porém quando confrontamos os resultados aos encontrados nos seres humanos é possível que a frequência do polimorfismo seja de baixa incidência.

O estudo do polimorfismo da IL-1 β apresentou 20 (21,3%) animais homozigotos AA, 40 (42,6%) animais homozigotos GG e 34 (36,2%) animais heterozigotos AG. Os resultados foram semelhantes aos encontrados por Watanabe et al. (2005) em seres humanos, porém os alelos eram diferentes. No estudo envolvendo 150 pacientes foi observado 53 (35,3%) pacientes homozigotos CC, 25 (16,7%) pacientes homozigotos TT e 72 (48%) pacientes heterozigotos CT; e não foi possível correlacionar os achados com a gravidade do caso.

Quando avaliamos os genótipos e os animais do mesmo grupo sepse, os animais com o genótipo GG apresentaram níveis significativamente mais elevados de IL-1 β quando comparados aos genótipos AA e AG. Segundo Watanabe e colaboradores (2005), a IL-1 β encontra-se aumentada nos estágios iniciais da sepse e inflamação. Desta forma, os animais em sepse homozigotos GG podem evoluir mais rapidamente para sepse grave do que os animais que não possuem este genótipo.

O presente estudo encontrou inúmeros contratempos, inicialmente o que mais desfavoreceu a pesquisa foram as análises genéticas. A quantidade e forma de armazenamento das amostras, bem como a extração do material genético, foram os desafios iniciais. A metodologia que seria empregada e o local da análise do material genético foi outro ponto importante e terceirização das análises não comprometeu os

resultados. Após a conclusão da pesquisa pode ser visualizado um novo panorama para futuros estudos, em vista da quantidade de informação sobre os genes dos cães disponível e as metodologias disponíveis para a análise destas informações é possível realizar a análise de todo o gene de interesse ou de segmentos maiores que apresentem interesse. Existem mais polimorfismos ligados as citocinas do estudo e outras, não somente com atividade inflamatória, mas as anti-inflamatórias. Além dos polimorfismos que aumentam a expressão, existem polimorfismos que diminuem a expressão dos genes. Desta forma, as futuras pesquisas não necessitam ser reducionistas, o processo inflamatório que leva ao choque séptico é muito complexo e o maior número de variáveis que puder ser estudado certamente contribuirá com informações importantes. A pesquisa da informação genética deve ser constante, quanto maior o número de animais certamente um número maior de alterações irão aparecer, o que contribuirá para uma melhor compreensão da influência das informações genéticas sobre o animal.

Devem ser realizados estudos sobre a circulação do útero com piometra e recém retirado cirurgicamente. O órgão possibilita a canulação das suas artérias para que seja perfundido com solução corante e visualiza-se as regiões mais acometidas; ou perfundir com solução hipotônica, isotônica ou hipertônica, para que se realize análise histopatológica e compare o efeito destas soluções no tecido uterino inflamado, além da coleta direta do órgão e do conteúdo líquido do processo infeccioso-inflamatório.

Diferente dos seres humanos, a pneumonia foi uma complicação pouco comum e o completo restabelecimento dos pacientes ocorreu em 100% dos animais que não foram a óbito. Possivelmente a postura quadrupedal dos cães exerce efeito protetor, pois mesmo que o animal esteja internado é possível deixá-lo em decúbito esternal. O posicionamento esternal mantém o coração no seu eixo normal e principalmente possibilita a manutenção da relação ventilação perfusão alveolar. O decúbito esternal e mesmo o lateral preserva a posição dos grandes vasos como aorta e cava, desta forma a perfusão dos pacientes em sepse não é tão prejudicada pela postura do animal.

Apesar da evidente possibilidade de maior compreensão dos processos inflamatórios, deve ser lembrado que cada órgão apresenta um tipo de tecido e certos cuidados devem ser tomados quando houver a necessidade de extrapolar resultados.

8 CONCLUSÃO

A estratificação da gravidade do caso para os animais em sepse grave é muito branda e não distingue os animais em estado mais grave dos menos grave dentro do mesmo grupo. Assim, é necessário realizar a estratificação em subgrupos ou pontuar a gravidade das disfunções de órgãos nos animais com piometra e em sepse grave. A divisão dos animais em sepse grave de acordo com a gravidade é de extrema relevância e certamente irá refletir no prognóstico, tempo de internação, morbidade e mortalidade dos pacientes. O mais relevante é a possibilidade do correto estadiamento da gravidade poder ser realizado com avaliações corriqueiras e empregadas de forma rotineira no atendimento dos pacientes.

A análise da concentração de lactato nos animais com piometra inicialmente reflete o acometimento uterino e não a disfunção sistêmica. Desta forma, a concentração circulante reflete mais uma diluição da produção de lactato pelo tecido uterino do que a produção sistêmica consequente da hipoperfusão tecidual e metabolismo anaeróbico.

A proteína C reativa e a IL-6 apresentam correlação direta com a gravidade do caso. A análise dessas substâncias pode e deve ser empregada na avaliação dos pacientes com suspeita ou confirmação de piometra. Devido a grande incidência da doença em cadelas, o desenvolvimento de metodologias de fácil acesso e rápida realização são de extrema importância para a avaliação dos pacientes.

O TNF- α e a IL-1 β não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, porém possuem papel importante na sinalização da sepse. Assim como o lactato foi coletado da veia uterina, amostras para a análise da concentração das citocinas e expressão de genes podem ser coletadas da circulação e do epitélio do órgão acometido.

A gravidade dos pacientes no momento do atendimento possui origem multifatorial; o polimorfismo do gene da IL-1 β e o tempo decorrido entre o início dos sintomas até que os proprietários procurassem ajuda médica foram os de maior relevância na pesquisa. Assim, o polimorfismo do gene da IL-1 β para o alelo GG influenciou diretamente a concentração da IL-1 β circulante nos animais em sepse predispondo a maior gravidade e o início dos sintomas dos animais em sepse não

excederam uma semana, os animais em sepse grave apresentaram início dos sintomas entre uma e três semanas, e os animais em choque séptico tiveram início dos sintomas à pelo menos três semanas.

Esta é a primeira pesquisa na Medicina Veterinária que estudou a influência genética na gravidade da sepse. Existe uma grande variedade de citocinas e para cada citocina existe uma grande variação genética com diferentes polimorfismos para o mesmo gene, com a capacidade de aumentar ou diminuir a sua expressão. A presente pesquisa analisou somente um polimorfismo para o gene do TNF- α e um para a IL-1 β . Desta forma, pesquisas clínicas com a informação genética são cada vez mais relevantes para montar um painel da atividade dos genes, correlacionar a influência que os polimorfismos exercem na expressão dos genes com a consequente produção ou não das citocinas e consequências sobre a gravidade do caso.

A piometra canina é um excelente modelo para a investigação da sepse em sua totalidade. A doença de ocorrência natural oferece ao pesquisador o material necessário para o estudo da condição física, metabólica, hematológica, inflamatória e genética do paciente, além de possibilitar a coleta de tais amostras sistêmicas e principalmente diretamente do órgão acometido. Devido ao tratamento da afecção ser a remoção cirúrgica do órgão acometido é possível realizar a coleta de sangue arterial e venoso das artérias e veias uterinas, coleta do tecido uterino e do agente infectante para a realização de análises diretamente sobre o órgão acometido. A análise detalhada destas amostras irá fornecer um novo panorama na pesquisa da sepse e dos mecanismos envolvidos *in situ*.

REFERÊNCIAS

ALI, N. A.; O'BRIEN JR, J. M.; DUNGAN, K.; PHILIPS, G.; MARSH, C. B.; LEMESHOW, S.; CONNORS Jr, A. F.; PREISER, J.C. Glucose variability and mortality in patients with sepsis. **Critical Care**, v. 36, n. 8, p. 2316–2321, 2008.

ANGUS, D. C.; LINDE-ZWIRBLE, W. T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M. R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 7, p. 1303–1310, 2001.

BALK, R. Roger C. Bone, MD and the evolving paradigms of sepsis. **Contributions to Microbiology**, v. 17, p. 1–11, 2011.

BATFALSKY, A.; LOHR, A.; HEUSSEN, N.; NEUNHOEFFER, F.; ORLIKOWSKY, T. W. Diagnostic value of an interleukin-6 bedside test in term and preterm neonates at the time of clinical suspicion of early- and late-onset bacterial infection. **Neonatology**, v. 102, n. 1, p. 37–44, 2012.

BLACKWELL, T. S.; CHRISTMAN, J. W. Sepsis and cytokines: current status. **British Journal of Anaesthesia**, v. 77, n. 1, p. 110–117, 1996.

BARRAND, K. R. Short Communications. Unilateral uterine torsion associated with haematometra and cystic endometrial hyperplasia in a bitch. **Veterinary Record**, v. 164, p. 19-20, 2009.

BOLLER, E. M.; OTTO, C. M. Sepsis. In: SILVERSTEIN, D.; HOPPER, K. **Small Animal Critical Care Medicine**. Missouri: Saunders Elsevier, 2009. p. 454-458.

BONE, R. C.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**, v. 112, n. 1, p. 235–243, 1997.

CHRISTMAN, J. W.; LANCASTER, L. H.; BLACKWELL, T. S. Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. **Intensive Care Medicine**, v. 24, n. 11, p. 1131–1138, 1998.

CHUNG, L. P.; WATERER, G. W. Genetic predisposition to respiratory infection and sepsis. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 48, n. 5-6, p. 250–268, 2011.

DABROWSKI, R.; KOSTRO, K.; LISIECKA, U.; SZCZUBIAŁ, 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, n. 4, p. 471–476, 2009.

DABROWSKI, R.; WAWRON, W.; KOSTRO, K. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with pyometra. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 321–327, 2007.

DE LAFORCADE, A. M.; ROZANSKI, E. A.; FREEMAN, L. M.; LI, W. Serial evaluation of protein C and antithrombin in dogs with sepsis. **Journal of veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 1, p. 26–30, 2008.

LAFORCADE, A. M.; FREEMAN, L. M.; SHAW, S. P.; BROOKS, M. B.; ROZANSKI, E. A.; RUSH, J. E. Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 5, p. 674, 2003.

DE VRIESE, A. S. Prevention and treatment of acute renal failure in sepsis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 3, p. 792–805, 2003.

DECLUE, A. E.; SHARP, C. R.; HARMON, M. Plasma inflammatory mediator concentrations at ICU admission in dogs with naturally developing sepsis. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 3, p. 624–630, 2012.

DEITCH, E. A.; ANANTHAKRISHNAN, P.; COHEN, D. B.; FEKETEOVA, E.; HAUSER, C. J. Neutrophil activation is modulated by sex hormones after trauma-hemorrhagic shock and burn injuries. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 3, p. H1456–1465, 2006.

DELLINGER, R. P.; LEVY, M. M.; RHODES, A.; ANNANE, D.; GERLACH, H.; OPAL, S. M.; SEVRANSKY, J. E.; SPRUNG, C. L.; DOUGLAS, I. S.; JAESCHKE, R.; OSBORN, T. M.; NUNNALLY, M. E.; TOWNSEND, S. R.; REINHART, K.; KLEINPELL, R. M.; ANGUS, D. C.; DEUTSCHMAN, C. S.; MACHADO, F. R.; RUBENDEL, G. D.; WEBB, S.; BEALE, R. J.; VINCENT, J. L.; MORENO, R. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 2, p. 580–637, 2013.

DICKSON, S. Sepsis and multiple organ failure. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 10, n. 4, p. 165–168, 2009.

EGENVALL, A.; HAGMAN, R.; BONNETT, B. N.; HEDHAMMAR, A.; OLSON, P.; LAGERSTEDT, A. S. Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 6, p. 530–538, 2001.

ELIASSEN, M.; EGESTEN, A. Antibacterial chemokines factors in both innate and adaptive immunity. **Contributions to Microbiology**, v. 15, p. 101–117, 2008.

FAIX, J. D. Biomarkers of sepsis. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 50, n. 1, p. 23–36, 2013.

FINK, M. P. Cytopathic hypoxia. Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. **Critical Care Clinics**, v. 17, n. 1, p. 219–237, 2001.

FITROLAKI, D. M.; DIMITRIOU, H.; KALMANTI, M.; BRIASSOULIS, G. CD64-Neutrophil expression and stress metabolic patterns in early sepsis and severe traumatic brain injury in children. **BMC pediatrics**, v. 13, n. 1, p. 31, 2013.

FRANSSON, B. A.; LAGERSTEDT, A. S.; BERGSTROM, A.; HAGMAN, R.; PARK, J. S.; CHEW, B. P.; RAGLE, C. A. C-reactive protein, tumor necrosis factor α , and interleukin-6 in dogs with pyometra and SIRS. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 17, n. 4, p. 373–381, 2007.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 6, p. 448–454, 1999.

GARRABOU, G.; MORÉN, C.; LÓPEZ, S.; TOBÍAS, E.; CARDELLACH, F.; MIRÓ, Ò.; CASADEMONT, J. The effects of sepsis on mitochondria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 3, p. 392–400, 2012.

GHEZZI, P.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor as a pharmacological target. **Molecular Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 239–244, 2005.

GIBSON, A.; DEAN, R.; YATES, D.; STAVISKY, J. A retrospective study of pyometra at five RSPCA hospitals in the UK: 1728 cases from 2006 to 2011. **The Veterinary Record**, v. 173, n. 16, p. 396, 2013.

GIFFORD, ANGELA T.; SCARLETT, JANET M.; SCHLAFFER, DONALD H. Histopathologic findings in uterine biopsy samples from subfertile bitches: 399 cases (1990–2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 244, n. 2, p. 180–186, 2014.

GILLE-JOHNSON, P.; SMEDMAN, C.; GUDMUNSDOTTER, L.; SOMELL, A.; NIHLMARK, K.; PAULIE, S.; GÅRD Lund, B. Circulating monocytes are not the major source of plasma cytokines in patients with sepsis. **Shock**, v. 38, n. 6, p. 577–583, 2012.

GLAUSER, M. P.; ZANETTI, G.; BAUMGARTNER, J. D.; COHEN, J. Septic shock: pathogenesis. **The Lancet**, v. 338, n. 8769, p. 732–736, 1991.

HAGMAN, R.; REEZIGT, B. J.; LEDIN, H. B.; KARLSTAM, E. Blood lactate levels in 31 female dogs with pyometra. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, p. 2, 2009.

HAGMAN, R.; LAGERSTEDT, A. S.; HEDHAMMAR, A.; EGENVALL, A. A breed-matched case-control study of potential risk-factors for canine pyometra. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1251–1257, 2011.

HAGMAN, R. Clinical and molecular characteristics of pyometra in female dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 323–325, 2012, Suppl 6.

HAGMAN, R. Diagnostic and prognostic markers for uterine diseases in dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. s2, p. 16–20, 2014.

HAGMAN, R.; KINDAHL, H.; LAGERSTEDT, A. S. Pyometra in bitches induces elevated plasma endotoxin and prostaglandin F₂α metabolite levels. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 47, n. 1, p. 55–67, 2006.

HAGMAN, R.; RÖNNBERG, E.; PEJLER, G. Canine uterine bacterial infection induces upregulation of proteolysis-related genes and downregulation of homeobox and zinc finger factors. **PloS one**, v. 4, n. 11, p. e8039, 2009.

HAUPTMAN, J. G.; WALSHAW, R.; OLIVIER, N. B. Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 26, n. 5, p. 393–397, 1997.

HERRMANN, F. R.; SAFRAN, C.; LEVKOFF, S. E.; MINAKER, K. L. Serum albumin level on admission as a predictor of death, length of stay, and readmission. **Archives of Internal Medicine**, v. 152, n. 1, p. 125–130, 1992.

HIRASAWA, H. Blood glucose control in patients with severe sepsis and septic shock. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 33, p. 4132 – 4136, 2009.

HOLST, B. S.; GUSTAVSSON, M. H.; LILLIEHOOK, I.; MORRISON, D.; JOHANNISON, A. Leucocyte phagocytosis during the luteal phase in bitches. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 153, n. 1-2, p. 77–82, 2013.

HOPPER, K.; HASKINS, S. C. A case-based review of a simplified quantitative approach to acid-base analysis. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 18, n. 5, p. 467–476, 2008.

ISHIDA, A.; OHNO, K.; FUKUSHIMA, K.; NAKASHIMA, K.; TAKAHASHI, M.; GOTO-KOSHINO, Y.; FUJINO, Y.; TSUJIMOTO, H. Plasma high-mobility group box 1 (HMGB1) in dogs with various diseases: comparison with C-reactive protein. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 73, n. 9, p. 1127–1132, 2011.

JELLINGE, M. E.; HENRIKSEN, D. P.; HALLAS, P.; BRABRAND, M. Hypoalbuminemia is a strong predictor of 30-day all-cause mortality in acutely admitted medical patients: a prospective, observational, cohort study. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e105983, 2014.

JITPEAN, S.; HAGMAN, R.; STROM, H. B.; HOGLUND, O. V.; PETTERSON, A.; EGENVALL, A. Breed variations in the incidence of pyometra and mammary tumours in Swedish dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 347–350, 2012, Suppl 6.

JITPEAN, S.; STROM, H. B.; EMANUELSON, U.; HOGLUND, O. V.; PETTERSON, A.; ALNERYD-BULL, C.; HAGMAN, R. Outcome of pyometra in female dogs and predictors of peritonitis and prolonged postoperative hospitalization in surgically treated cases. **BMC Veterinary Research**, v. 10, p. 6, 2014.

KANAI, S.; HONDA, T.; UEHARA, T.; MATSUMOTO, T. Liver function tests in patients with bacteremia. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 22, n. 1, p. 66–69, 2008.

KARLSSON, I.; HAGMAN, R.; JOHANNISSON, A.; WANG, L.; KARLSTAM, E.; WERNERSSON, S. Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 337–341, 2012, Suppl 6.

KARLSSON, I.; WERNERSSON, S.; AMBROSEN, A.; KINDAHL, H.; SÖDERSTEN, F.; WANG, L.; HAGMAN, R. Increased concentrations of C-reactive protein but not high-mobility group box 1 in dogs with naturally occurring sepsis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 156, n. 1-2, p. 64–72, 2013.

KELLUM, J. A. Metabolic acidosis in patients with sepsis: epiphenomenon or part of the pathophysiology? **Critical care and resuscitation : journal of the Australasian Academy of Critical Care Medicine**, v. 6, n. 3, p. 197–203, 2004.

KIM, K. S.; LEE, S. E.; JEONG, H. W.; HA, J. H. The Complete Nucleotide Sequence of the Domestic Dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 10, n. 2, p. 210–220, 1998.

KINOSHITA, A.; ONODA, H.; IMAI, N.; IWAKU, A.; OISHI, M.; TANAKA, K.; MATSUSHIMA, M. The C-Reactive Protein/Albumin Ratio, a Novel Inflammation-Based Prognostic Score, Predicts Outcomes in Patients with Hepatocellular Carcinoma. **Annals of Surgical Oncology**, p. 1-8, 2014.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **International Reviews of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 16–34, fev. 2011.

LANDRY, D. W.; OLIVER, J. A. The pathogenesis of vasodilatory shock. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 8, p. 588–595, 2001.

LEVY, B. Lactate and shock state: the metabolic view. **Current Opinion in Critical Care**, v. 12, n. 4, p. 315–321, 2006.

LEVY, M. M.; DELLINGER, R. P.; TOWNSEND, S. R.; LINDE-ZWIRBLE W. T.; MARSHALL, J. C.; BION, J.; SCHORR, C.; ARTIGAS, A.; RAMSAY, G.; BEALE, R.; PARKER, M. M.; GERLACH H.; REINHART, K.; SILVA, E.; HARVEY, M.; REGAN, S.; ANGUS, D. C. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. **Intensive Care Medicine**, v. 36, n. 2, p. 222–231, 2010.

LINDBLAD-TOH, K.; WADE, C. M.; MIKKELSEN, T. S.; LANDER, E. S. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, v. 438, n. 7069, p. 803–819, 2005.

LIVINGSTON, D. H.; ANJARIA, D.; WU, J.; HAUSER, C. J.; CHANG, V.; DEITCH, E. A.; RAMESHWAR, P. Bone marrow failure following severe injury in humans. **Annals of Surgery**, v. 238, n. 5, p. 748–753, 2003.

LYONS, O.; WHELAN, B.; BENNETT, K.; O'RIORDAN, D.; SILKE, B. Serum albumin as an outcome predictor in hospital emergency medical admissions. **European Journal of Internal Medicine**, v. 21, n. 1, p. 17–20, 2010.

MACIEL, G. S.; USCATEGUI, R. R.; ALMEIDA, V. T.; OLIVEIRA, M. E. F.; FELICIANO, M. A. R.; VICENTE, W. R. R. Quantity of IL-2, IL-4, IL-10, INF- γ , TNF- α and KC-like cytokines in serum of bitches with pyometra in different stages of oestrous cycle and pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 4, p. 701–704, 2014.

MADDENS, B.; DAMINET, S.; SMETS, P.; MEYER, E. Evaluation of kidney injury in dogs with pyometra based on proteinuria, renal histomorphology, and urinary biomarkers. **Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 5, p. 1075–1083, 2011.

MAJUMDAR, A. Sepsis-induced acute kidney injury. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 14, n. 1, p. 14–21, 2010.

MALATESHA, G.; SINGH, N. K.; BHARIJA, A.; REHANI, B.; GOEL, A. Comparison of arterial and venous pH, bicarbonate, PCO₂ and PO₂ in initial emergency department assessment. **Emergency Medicine Journal**, v. 24, n. 8, p. 569–571, 2007.

MARTIN, G. S.; MANNINO, D. M.; EATON, S.; MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **The New England journal of Medicine**, v. 348, n. 16, p. 1546–1554, 2003.

MICHELON, T.; SILVEIRA, J. G.; GRAUNDEZ, M.; NEUMANN, J.;. Imunologia da gestação. **Revista da AMRIGS**, v. 50, n. 2, p. 145–151, 2006.

MIDDLETON, P.; KELLY, A. M.; BROWN, J.; ROBERTSON, M.; Agreement between arterial and central venous values for pH, bicarbonate, base excess, and lactate. **Emergency Medicine Journal**, v. 23, n. 8, p. 622–624, 2006.

MIRA, J. P.; CARIOU, A.; GRALL, F.; DELCLAUX, C.; LOSSER, M. R.; HESHMATI, F.; DHAINAUT, J. F. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. **The Journal of the American Medical Association**, v. 282, n. 6, p. 561–568, 1999.

MOVIAT, M.; VAN DEN BOOGAARD, M.; INTVEN, F.; VAN DER VOORT, P.; VAN DER HOEVEN, H.; PICKKERS, P. Stewart analysis of apparently normal acid-base state in the critically ill. **Journal of Critical Care**, v. 28, n. 6, p. 1048–1054, 2013.

NAHM, C. H.; CHOI, J. W.; LEE, J. Delta neutrophil index in automated immature granulocyte counts for assessing disease severity of patients with sepsis. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 38, n. 3, p. 241–246, 2008.

NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, M.; OHNO, K.; KOSHINO, A.; NAKASHIMA, K.; SETOGUCHI, A.; TSUJIMOTO, H. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 70, n. 2, p. 127–131, 2008.

NEMZEK, J. A.; SIDDIQUI, J.; REMICK, D. G. Development and optimization of cytokine ELISAs using commercial antibody pairs. **Journal of Immunological Methods**, v. 255, n. 1-2, p. 149–157, 2001.

NEVEU, H. D. F. P. P.; KLEINKNECHT, D.; BRIVET, F.; LOIRAT, P. H.; LANDAIS, P. Prognostic factors in acute renal failure due to sepsis. Results of a prospective multicentre study. The French Study Group on Acute Renal Failure. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 11, n. 2, p. 293-299, 1996.

NI CHOILEAIN, N.; REDMOND, H. P. The immunological consequences of injury. **The surgeon : Journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland**, v. 4, n. 1, p. 23–31, 2006.

NORITOMI, D. T.; SORIANO, F. G.; KELLUM, J. A.; CAPPI, S. B.; BISELLI, P. J.; LIBÓRIO, A. B.; PARK, M. Metabolic acidosis in patients with severe sepsis and septic shock: A longitudinal quantitative study. **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 10, p. 2733–2739, 2009.

OPAL, S. M.; COHEN, J. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? **Critical Care Medicine**, v. 27, n. 8, p. 1608–1616, 1999.

ORTEGA-PACHECO, A.; GUTIÉRREZ-BLANCO, E.; JIMÉNEZ-COELLO, M. Common lesions in the female reproductive tract of dogs and cats. **The Veterinary Clinics of North America. Small animal practice**, v. 42, n. 3, p. 547–559, 2012.

OUDEMANS-VAN STRAATEN, H. M.; JANSSEN, P. G. M.; BEENAKKERS, I. C. M.; STOUTENBEEK, C. P.; VAN DEVENTER, S. J. H.; STURK, A.; WILDEVUUR, C. R. Increased oxygen consumption after cardiac surgery is associated with the inflammatory response to endotoxemia. **Intensive Care Medicine**, v. 22, n. 4, p. 294–300, 1996.

PANACEK, E. A.; MARSHALL, J. C.; ALBERTSON, T. E.; JOHNSON, D. H.; JOHNSON, S.; MACARTHUR, R. D.; DOIG, C. Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')₂ fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. **Critical Care Medicine**, v. 32, n. 11, p. 2173–2182, 2004.

PARK, B. H.; KANG, Y. A.; PARK, M. S.; JUNG, W. J.; LEE, S. H.; LEE, S. K.; KIM, Y. S. Delta neutrophil index as an early marker of disease severity in critically ill patients with sepsis. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 299, 2011.

PATEL, R. T.; DEEN, K. I.; YOUNGS, D.; WARWICK, J.; KEIGHLEY, M. R. B. Interleukin 6 is a prognostic indicator of outcome in severe intra-abdominal sepsis. **The British Journal of Surgery**, v. 81, n. 9, p. 1306–1308, 1994.

PISARCHIK, A. N.; POCHEPEN, O. N.; PISARCHYK, L. A. Increasing blood glucose variability is a precursor of sepsis and mortality in burned patients. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e46582, 2012.

PRETZER, S. D. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: a review. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 359–363, 2008.

RAU, S.; KOHN, B.; RICHTER, C.; FENSKE, N.; KÜCHENHOFF, H.; HARTMANN, K.; HIRSCHBERGER, J. Plasma interleukin-6 response is predictive for severity and mortality in canine systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, n. 3, p. 253–260, 2007.

ROBERTSON, C. M.; COOPERSMITH, C. M. The systemic inflammatory response syndrome. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 5, p. 1382–1389, 2006.

SMITH, F. O. Canine pyometra. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 610–612, 2006.

SONG, R.; KIM, J.; YU, D.; PARK, C.; PARK, J. Kinetics of IL-6 and TNF- α changes in a canine model of sepsis induced by endotoxin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 146, n. 2, p. 143–149, 2012.

STANDAGE, S. W.; WONG, H. R. Biomarkers for pediatric sepsis and septic shock. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 9, n. 1, p. 71–79, 2011.

STÜBER, F. Effects of genomic polymorphisms on the course of sepsis: is there a concept for gene therapy? **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 12, p. S60–64, 2001, Suppl 1.

SUGIURA, K.; NISHIKAWA, M.; ISHIGURO, K.; TAJIMA, T.; INABA, M.; TORII, R.; INABA, T. Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. **Immunobiology**, v. 209, n. 8, p. 619–627, 2004.

TANIGUCHI, L. U.; BIERRENBACH, A. L.; TOSCANO, C. M.; SCHETTINO, G. P.; AZEVEDO, L. C. Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. **Critical Care**, v. 18, n. 6, p. 608, 2014.

TAYLOR, B. S.; GELLER, D. A. Molecular regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. **Shock**, v. 13, n. 6, p. 413–424, 2000.

TOFFALETTI, J. G. Blood lactate: biochemistry, laboratory methods, and clinical interpretation. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 28, n. 4, p. 253–268, 1991.

TREGER, R.; PIROUZ, S.; KAMANGAR, N.; CORRY, D. Agreement between central venous and arterial blood gas measurements in the intensive care unit. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, n. 3, p. 390–394, 2010.

UEDA, T.; AOYAMA-ISHIKAWA, M.; NAKAO, A.; YAMADA, T.; USAMI, M.; KOTANI, J. A simple scoring system based on neutrophil count in sepsis patients. **Medical Hypotheses**, v. 82, n. 3, p. 382–386, 2014.

ULEVITCH, R. J.; TOBIAS, P. S. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. **Current Opinion in Immunology**, v. 11, n. 1, p. 19–22, 1999.

VAN AMERSFOORT, E. S.; VAN BERKEL, T. J. C.; KUIPER, J. Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 379–414, 2003.

VENET, C.; ZENI, F.; VIALLO, A.; ROSS, A.; PAIN, P.; GERY, P.; BERTRAND, J. C. Endotoxaemia in patients with severe sepsis or septic shock. **Intensive Care Medicine**, v. 26, n. 5, p. 538–544, 2000.

VOLPATO, R.; RODELLO, L.; ABIBE, R. B.; LOPES, M. D. Lactate in bitches with pyometra. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47 Suppl 6, p. 335–336, 2012.

WAESCHLE, R. M.; MOERER, O.; HILGERS, R.; HERRMANN, P.; NEUMANN, P.; QUINTEL, M. The impact of the severity of sepsis on the risk of hypoglycaemia and glycaemic variability. **Critical Care**, v. 12, n. 5, p. R129, 2008.

WELSCH, T.; FROMMHOLD, K.; HINZ, U.; WEIGAND, M. A.; KLEEFF, J.; FRIESS, H.; SCHMIDT, J. Persisting elevation of C-reactive protein after pancreatic resections can indicate developing inflammatory complications. **Surgery**, v. 143, n. 1, p. 20–28, 2008.

APÊNDICES

Apêndice A – Qualidade e quantidade (ng) das amostras de DNA dos animais utilizados na pesquisa
– São Paulo – 2012/2014

Amostras	260/280	260/230	ng	Amostras	260/280	260/230	ng
1	1,96	1,68	43,30	48	1,98	1,06	52,16
2	1,65	1,31	65,03	49	2,00	1,09	66,00
3	1,91	1,91	199,50	50	2,03	1,55	118,80
4	2,08	1,12	40,15	51	1,91	1,05	86,23
5	1,87	1,39	45,15	52	1,90	1,21	51,88
6	1,74	1,91	63,81	53	1,93	1,27	71,92
7	1,79	0,58	45,82	54	1,65	0,57	25,51
8	1,92	1,08	79,02	55	1,65	0,84	42,86
9	2,59	0,72	23,52	56	1,94	1,03	43,89
10	2,18	0,92	38,97	57	1,70	0,83	114,50
11	1,99	0,92	42,01	58	1,95	0,98	41,80
12	2,09	1,30	67,92	59	1,91	1,24	70,45
13	2,04	1,38	70,05	60	1,80	0,64	34,53
14	2,00	1,01	45,72	61	1,95	1,15	70,26
15	1,86	1,11	79,23	62	1,73	1,00	40,01
16	2,13	1,24	53,93	63	1,95	1,35	108,50
17	2,13	0,91	34,54	64	1,80	0,52	40,38
18	1,88	1,21	49,96	65	1,84	1,12	97,24
19	2,06	1,36	48,48	66	1,25	0,27	66,03
20	2,00	1,61	49,35	68	1,94	0,75	29,72
21	1,75	0,45	11,22	69	1,22	0,22	46,89
22	1,92	1,86	66,59	70	1,44	0,29	16,74
23	1,90	1,57	50,36	71	1,15	0,19	32,59
24	1,99	1,93	72,64	72	1,75	0,28	9,58
25	2,07	1,45	75,53	73	1,48	0,51	177,00
26	1,99	1,63	60,24	74	1,08	0,17	20,98
27	1,79	0,88	37,21	75	1,83	0,80	44,68
28	1,75	1,05	66,89	76	1,35	0,15	8,04
29	1,60	0,66	41,14	77	1,70	0,66	132,00
30	1,84	1,26	79,36	78	1,78	0,49	30,37
31	1,72	0,67	16,77	79	3,47	0,13	3,07
32	1,73	0,69	55,71	80	1,83	0,59	23,62
33	1,87	1,43	66,85	81	1,78	0,28	7,59
34	1,63	0,66	30,85	82	1,86	0,58	25,03
35	1,87	1,02	45,36	83	1,91	0,97	66,47
37	1,95	0,80	42,06	84	1,77	0,64	41,82
38	2,17	0,96	31,88	85	1,69	0,93	53,70
39	2,07	0,98	37,83	86	1,53	0,72	161,70
40	2,05	0,59	21,31	87	1,87	1,63	93,51
41	2,00	1,24	63,08	88	1,77	1,07	34,23
42	1,93	1,83	202,60	89	1,87	0,93	25,92
43	2,25	0,85	38,38	90	1,95	1,25	56,46
44	1,95	1,25	81,76	91	2,02	0,37	10,82
45	1,80	0,80	22,42	92	1,89	1,17	65,25
46	2,03	1,17	65,31	93	1,95	0,66	23,99
47	1,91	0,89	48,67	94	2,07	0,63	15,79

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Apêndice B – Idade (anos), peso (kg), raça, gravidade, genótipo da IL-1 β , frequência cardíaca (batimentos por minuto), do tempo de preenchimento capilar (segundos), pressão arterial sistólica e diastólica (mmHg), da frequência respiratória (movimentos por minuto), da temperatura (graus Celsius), da glicemia (mg/dl), número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$), da concentração de hemoglobina (g/dl), do hematócrito (%), dos leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{l}$), dos neutrófilos totais (μl), dos bastonetes (%), dos segmentados (%), das plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$), da proteína total (g/dl), da alanina aminotransferase (U/L), da fosfatase alcalina (U/L), da ureia (mg/dl), da creatinina (mg/dl), do lactato (mmol/L), do potencial hidrogeniônico (pH), da pressão parcial de oxigênio no sangue venoso (PvO₂ – mmHg), da pressão parcial de gás carbônico no sangue venoso (PvCO₂ – mmHg), do bicarbonato (HCO₃ – mEq/L), da saturação venosa de oxigênio (SvO₂ - %), do excesso de base (BE), do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α - pg/ml), da interleucina 1 beta (IL-1 β - ng/ml), da interleucina 6 (IL-6 - pg/ml) e da proteína C reativa (CRP - ng/ml) dos animais utilizados na pesquisa – São Paulo – 2012/2014

continua

Variável	Animal								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Idade	8	13	12	9	10	9	8	13	10
Peso	33,0	7,9	3,6	37	2	45	3	13	4
Raça	Pas Bco	Teckel	Pood	Boxer	Pinsc	Golden	Pinsc	SRD	Pood
Gene IL-1β	AA	GG	AG	GG	AG	AA	GG	AG	GG
Gravidade	S Gr	S Gr	S Gr	Sepse	S Gr	S Gr	S Gr	S Gr	S Gr
FC	100	140	105	145	120	110	95	110	180
TPC	2	3	3	2	3	2	3	3	3
PAS	160	120	160	235	115	190	140	175	245
PAD	90	80	70	145	55	105	45	110	140
FR	36	40	52	60	40	60	40	44	60
Temp	38,0	37,3	37,9	38,5	37,6	38,8	38,5	38,5	39
Glic	100	80	73	87	64	99	59	106	157
Hem	5,8	5,7	5,3	5,3	6,3	5	5,1	5,5	7,9
Hg	12,9	13,4	11,8	12,1	14,9	11,3	10,9	11,2	17,7
Ht	38	38	36	33	44	33	35	36	53
Leuc	14,3	57,5	114	20,6	22,1	19,3	10,9	40,9	28,2
Neutr	84	72	76	72	88	92	90	86	76
Bast	0	8	0	0	0	0	0	0	0
Segm	84	64	76	72	88	92	90	86	76
Plaq	195	138	294	348	31	188	22	367	134
PT	6,3	8,2	8,3	7,7	5,3	6,6	4,8	6,8	7,3
Alb	2,4	2,3	2,3	2,3	2,1	3,1	2,2	2,2	2,7
Alt	80	11	8,4	17,2	23,6	38,1	13,8	10,4	20,2
FA	30,4	123,8	46,6	54,9	438	71,1	259,2	77	193
Ureia	12,8	212,4	28,8	33,4	51,3	43,7	59,9	130,4	62,2
Creat	0,64	2,7	0,75	0,97	0,61	0,91	0,55	5,2	1,1
Lactato	3,4	2,8	3	2,3	4,1	3	3,3	3,9	6,8
pH	7,3	7,3	7,1	7,4	7,3	7,32	7,23	7,38	7,37
PvO₂	65	65	56	60	35	56	65	90	58
PvCO₂	24	33	23	29	53	40	23	25	20
HCO₃	16	17	14	17	12	16	12	14	10
SvO₂	68	78	67	60	54	76	56	55	70
BE	-6	-6	-14	-5	-13	-5	-8	-9	-8
TNF-α	1,67	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-1β	0,69	6,29	6,29	0,63	1,23	6,29	0,35	2,65	0,96
IL-6	267,16	291,64	163,9	104	8,33	0	0	79,13	42,39
CRP	102,53	98,95	30,1	163,51	65	5,95	64,66	212,1	237,1

(continuação)

Variável	Animal								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Idade	8	7	11	11	5	9	9	14	6
Peso	23	8	10,7	6,6	6	7	9,2	6	15,6
Raça	P Bull	Teckel	SRD	Pood	SRD	SRD	SRD	SRD	SRD
Gene IL-1β	GG	GG	GG	GG	AG	GG	GG	AG	AG
Gravidade	S Gr	S Gr	S Gr	S Gr	Sepse	S Gr	S Gr	Sepse	S Gr
FC	140	175	160	140	135	130	155	120	120
TPC	3	3	3	3	2	2	2	1	2
PAS	160	130	145	150	200	170	160	200	150
PAD	90	70	65	105	140	110	105	60	80
FR	40	52	32	60	36	44	36	52	32
Temp	38,5	38,7	38,1	37,7	38,3	38,7	38,7	38,4	39,4
Glic	116	74	155	152	90	110	107	96	92
Hem	1,6	7,6	3,4	5,8	7,5	6	3,7	5,2	5,9
Hg	3,7	16,5	8,6	12,2	17,1	13,7	8,8	11,9	13,5
Ht	10	52	24	38	48	39	26	35	40
Leuc	36,1	6,5	59,3	34,7	19,7	12,3	57,1	59,8	20,87
Neutr	84	70	73	78	82	92	88	84	82
Bast	8	0	12	0	1	0	26	0	0
Segm	72	70	58	78	81	92	58	84	82
Plaq	65	334	305	204	328	194	181	254	80
PT	4,7	6,7	6,7	6,6	7	5,9	6,7	6,2	6,9
Alb	1,6	3,4	2,8	2,6	2,8	2,5	2,7	2,7	2,4
Alt	10,1	14,5	9,8	10,4	26,3	15	11	9,6	9,3
FA	97,5	88,2	47	61,1	48	183,9	41	58,3	51,4
Ureia	55,7	13,4	174,2	41,5	17,8	31	16	20	24,8
Creat	0,77	0,68	0,8	1,16	0,77	0,66	0,5	0,67	0,85
Lactato	3,9	4,2	3,9	3,8	2,2	3,7	1,5	2,5	5,2
pH	7,23	7,39	7,4	7,29	7,34	7,3	7,35	7,42	7,37
PvO₂	29	58	57	54	60	40	56	33	31
PvCO₂	36	23	30	28	30	33	34	24	33
HCO³	22	14	30	14	16	18	18	15	19
SvO₂	54	89	68	63	80	87	67	64	57
BE	-6	-8	7	-10	-8	-5	-6	-7	-5
TNF-α	0	1,41	0	0	0	0	0	0	6,8
IL-1β	5,09	0,4	2,78	3,48	1,07	1,68	0,47	6,29	0,58
IL-6	100,59	5,83	0	25,29	45,6	249,38	1346,85	55,28	31,47
CRP	105,11	67,66	56,7	100,68	78,9	80,86	607,3	200,3	148,21

(continuação)

Variável	Animal								
	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Idade	4	12	12	13	7	10	13	11	9
Peso	30	23	4	18	26	8,5	7,7	35	15
Raça	SRD	Dálm	SRD	SRD	SRD	SRD	SRD	Rott	SRD
Gene IL-1β	GG	GG	AG	GG	AA	AG	GG	AG	AA
Gravidade	S Gr	S Gr	S Gr	Sepse	Sepse	S Gr	S Gr	S Gr	S Gr
FC	155	100	160	140	120	125	120	120	145
TPC	3	3	2	3	2	1	2	2	3
PAS	140	180	230	200	200	160	130	180	140
PAD	100	60	130	150	140	105	95	90	85
FR	52	44	60	60	60	44	24	60	60
Temp	39	39,2	38,5	39	39	38	38,6	39,6	38,8
Glic	64	118	65	60	85	98	132	84	88
Hem	5,3	4,6	5,1	6,1	6,5	5,3	5,6	4,7	6,7
Hg	11,4	10	10,7	13,3	14,1	10,3	13,6	10,4	14,1
Ht	35	30	32	41	41	33	39	29	44
Leuc	39,8	21	41,8	21,9	23,3	40,3	28,9	35,1	20,7
Neutr	78	72	80	98	70	96	78	82	80
Bast	12	0	2	0	8	0	4	0	0
Segm	64	72	78	98	62	96	74	82	80
Plaq	164	417	149	237	220	154	173	312	104
PT	7,7	6,4	7,1	6,4	6,6	5,3	7,2	6,4	6,8
Alb	2,2	2	2,2	2,3	2,5	1,9	2,7	2,1	2,4
Alt	18,8	15,3	10,6	15,9	8,8	14	17,3	8,4	9,8
FA	137	55,6	51,5	98,8	66,1	80,3	99,8	76,9	145,4
Ureia	38,4	10	45,6	44,9	34,6	45,3	52,6	15,9	18,3
Creat	1	0,7	0,61	0,81	0,84	1,2	0,84	0,67	0,8
Lactato	1,5	4,1	2	4	2,7	2,3	2,6	3	4
pH	7,3	7,26	7,25	7,36	7,31	7,28	7,36	7,29	7,32
PvO₂	60	70	45	46	60	66	31	50	56
PvCO₂	29	45	52	25	22	33	38	34	40
HCO₃	15	20	14	15	12	16	22	17	16
SvO₂	80	90	45	59	89	89	55	80	76
BE	-6	-6	-12	-8	-12	-10	-3	-9	-5
TNF-α	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-1β	2,6	4,86	6,29	1,82	1,27	1,72	2,36	1,53	6,24
IL-6	524,04	43,59	66,04	135,2	0	127,4	174,9	341,5	57,56
CRP	145,78	153,91	139,42	75,9	29,3	169,16	66,7	375,3	183,7

(continuação)

Variável	Animal								
	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Idade	11	13	12	7	12	8	13	8	14
Peso	30	10	8,8	35,2	10	6,6	3	22,2	6,6
Raça	Labr	SRD	Pood	Rottw	SRD	Pood	Pood	P Bull	SRD
Gene IL-1β	AG	GG	AA	AA	AG	GG	AG	AA	AA
Gravidade	S Gr	Sepse	S Gr	S Gr	Sepse	S Gr	S Gr	S Gr	S Gr
FC	120	135	210	150	135	166	160	125	155
TPC	2	1	2	3	2	3	3	3	2
PAS	170	180	120	155	125	175	200	125	130
PAD	85	100	50	95	70	105	95	40	65
FR	60	50	60	40	52	44	44	44	40
Temp	38	38	39,3	39,7	39,5	18,5	39,1	35,9	39,7
Glic	77	92	87	76	96	107	90	93	58
Hem	5,9	5,4	6,3	3,9	5	7	2,8	5	6,3
Hg	12,3	12,1	13,2	7,8	11,8	14,2	4,7	11,2	15
Ht	38	36	39	24	27	45	16	34	47
Leuc	12,92	23,5	45,1	29,1	43,5	113,6	89	40,2	20,2
Neutr	48	80	77	76	79	80	82	77	67
Bast	0	0	11	5	0	14	13	0	16
Segm	48	80	65	71	79	62	80	77	51
Plaq	152	200	86	50	544	207	178	60	51
PT	7	7,4	6,5	6	8	8,2	6,4	8	6,6
Alb	2,2	2,5	2,3	1,8	2,3	2,6	2,5	1,8	2,2
Alt	13,2	23,1	39,1	11,8	17,2	19,7	31	9,7	4,7
FA	61,7	30,3	271,4	211,5	54	188,9	75,6	317,7	164,9
Ureia	60,4	36,9	26,9	24,4	41,5	90,4	70	327,5	99,5
Creat	1,1	0,93	0,77	0,69	0,75	1,6	1,9	2,1	0,79
Lactato	4,5	2,8	3,2	1,9	2,9	8,1	1,8	3,3	3,9
pH	7,36	7,3	7,3	7,27	7,35	7,37	7,37	7,44	7,35
PvO₂	45	65	78	53	32	85	50	73	60
PvCO₂	30	33	25	23	35	16	30	29	27
HCO₃	20	14	14	12	19	9	17	20	14
SvO₂	70	75	79	69	58	62	60	62	80
BE	-6	-8	-9	-9	-5	-14	-7	-4	-9
TNF-α	0	0	3,25	0	7,4	0	0	0	0
IL-1β	6,29	0,13	1,98	2,65	0,96	3,15	1,33	1,21	0,34
IL-6	115,1	111,4	68,94	79,13	101,65	263,47	131,87	263,47	286,96
CRP	211,9	153,2	209,84	92,06	166,4	267,1	209,84	167,31	136,08

(continuação)

Variável	Animal								
	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Idade	9	12	1,6	6	6	6	11	9	7
Peso	13	24,6	12,3	25	23	6	7	38	30,6
Raça	SRD	SRD	SRD	P Bull	P Bull	Lhasa	Fox T	Rott	Golden
Gene IL-1β	AG	AG	AG	GG	GG	AA	GG	AA	AG
Gravidade	S Gr	Sepse	Sepse	S Gr	Sepse	Sepse	S Gr	S Gr	S Gr
FC	125	140	80	135	135	145	140	130	120
TPC	3	1	2	2	2	1	2	2	2
PAS	130	160	160	180	180	150	100	115	150
PAD	85	85	80	100	100	90	60	45	90
FR	44	60	60	36	36	32	44	36	40
Temp	38,9	38,7	38	38,3	38,3	38,3	38	39	38,9
Glic	102	74	82	74	90	100	110	92	93
Hem	4,4	6,2	5,7	7,5	7,5	6,8	6,6	5	6,2
Hg	10,1	14,6	12,4	17,1	17,1	12,1	14,3	10,1	15,4
Ht	28	46	36	48	48	40	44	31	44
Leuc	60,3	30,4	29	19,7	19,7	16,7	8,3	30,7	20,3
Neutr	85	86	84	81	82	82	64	72	69
Bast	9	2	0	3	1	1	0	0	0
Segm	74	84	84	78	81	81	64	72	69
Plaq	72	303	258	328	328	300	267	211	369
PT	7,61	7	6,5	7	7	7,3	5,8	6,7	6,9
Alb	1,8	2,7	2,2	2,7	2,7	2,8	2,2	2	3,4
Alt	12,1	13,1	13,9	13,1	19,9	26,9	24	8,4	15,5
FA	138	150	96,8	162,4	132,2	54,6	54	63,8	39,9
Ureia	111,1	38,5	28,4	51,5	29,5	26	14	72,3	30,9
Creat	1,02	1,1	0,73	0,75	0,67	0,6	0,7	1,29	0,97
Lactato	2,5	2,7	2,8	3	2,2	1,8	1,8	3,5	2,5
pH	7,3	7,36	7,42	7,65	7,31	7,32	7,34	7,32	7,33
PvO₂	45	51	33	33	43	49	61	56	58
PvCO₂	45	29	24	36	43	40	45	20	22
HCO₃	8	16	15	19	20	20	16	12	11
SvO₂	59	83	64	59	67	50	88	80	74
BE	-10	-7	-7	-5	-4	-4	-14	-9	-5
TNF-α	0,32	0	0	0	10,77	8,26	0	0	0,95
IL-1β	0,45	1,09	0,43	0,09	3,27	0,23	6,29	0,7	2,18
IL-6	143,3	120,7	46,11	102,86	101,65	8,26	47,15	121,53	50,45
CRP	209,84	209,84	53,42	65,7	332,4	100,6	741,1	179,7	292,3

(continuação)

Variável	Animal								
	46	47	48	49	50	51	52	53	54
Idade	11	7	14	14	3	10	8	13	9
Peso	24	4,5	7,6	3,5	7	23	12	12	31
Raça	P Bull	Pood	Fox T	Pinsc	SRD	SRD	SRD	SRD	P Bull
Gene IL-1β	GG	GG	AA	AA	GG	GG	AA	AG	AG
Gravidade	Choque	S Gr	S Gr	S Gr	S Gr	S Gr	S Gr	Sepse	S Gr
FC	165	160	130	125	145	120	165	145	130
TPC	3	2	2	2	2	2	2	1	2
PAS	85	140	170	200	165	150	170	140	140
PAD	35	100	95	120	95	90	65	90	75
FR	60	40	44	36	44	36	36	50	40
Temp	37,4	38,5	39,1	38,5	38,3	38,5	37,4	39	40
Glic	195	47	93	72	82	90	123	103	66
Hem	4	3,3	4,8	5,3	3,9	6,9	1,7	5,1	5,9
Hg	9,1	8	9,1	12,3	9,2	15,3	3,6	12	13,2
Ht	26	25	29	36	26	45	13	34	39
Leuc	66,6	36,5	52,9	47,6	98,5	37,7	36,2	24,6	6,98
Neutr	77	60	82	75	84	82	74	82	84
Bast	2	6	0	2	5	0	2	0	0
Segm	75	54	82	73	79	82	72	82	84
Plaq	146	237	539	272	223	242	167	200	43
PT	8,1	6,4	8,3	8,9	9,3	6,9	8,6	8	6,6
Alb	1,9	1,8	2,6	2,1	2	2,7	2,3	3	2,8
Alt	13	24,4	11	21	13,4	14,4	63,9	30	17,1
FA	123	246,2	34,6	350,9	149,7	83,4	93,1	45	171,4
Ureia	236	24,3	25,8	232,5	162	41,7	66,1	26,1	46,4
Creat	7,9	0,43	0,62	1,5	0,76	1	0,82	0,68	0,95
Lactato	5	1,6	3,1	3,6	3	3,7	3,9	2,7	4,4
pH	7,25	7,13	7,39	7,27	7,29	7,37	7,37	7,3	7,38
PvO₂	46	52	30	35	34	29	28	30	33
PvCO₂	35	52	39	51	45	31	34	31	42
HCO₃	15	17	23	22	15	18	19	15	23
SvO₂	72	80	52	55	45	56	49	45	51
BE	-11	-12	-1	-4	-7	-6	-6	-10	0
TNF-α	14	0	0	0	12,9	6,6	3,95	22,86	32,1
IL-1β	5,6	0,06	0,68	0,3	0,73	6,29	6,29	3,39	1,48
IL-6	987,37	23,96	0	266,21	86,58	155,38	1,34	9,39	387,34
CRP	701,4	169,8	159,2	100,2	500,3	287,8	151,6	185	271,5

(continuação)

Variável	Animal								
	55	56	57	58	59	60	61	62	63
Idade	10	8	12	12	12	9	14	8	7
Peso	23	6,8	6	4	4	27	10	11,5	3,5
Raça	Akita	Pood	SRD	Pood	Pood	SRD	Schna	Schna	Pood
Gene IL-1β	GG	AG	AG	AG	AA	GG	AA	GG	GG
Gravidade	Sepse	Sepse	Choque	Sepse	S Gr	Sepse	S Gr	Sepse	S Gr
FC	130	115	120	130	130	120	133	125	130
TPC	3	2	3	2	2	1	1	3	2
PAS	140	155	95	145	135	120	185	140	190
PAD	80	75	60	80	80	80	110	90	110
FR	36	44	44	44	32	44	36	48	36
Temp	38	37,2	36,1	38	38,9	39	38,3	39	38,8
Glic	60	90	88	96	104	80	146	100	90
Hem	7	6	6	5,7	3,7	6	5,4	5,4	5,9
Hg	12	12,1	11,8	12,3	7,3	11,9	11,2	12	12,8
Ht	36	30	36	35	22	32	35	33	38
Leuc	21,9	50,4	57,5	31,4	17,5	25,1	34	32	80,3
Neutr	84	81	90	80	77	78	81	81	84
Bast	0	0	8	0	2	0	2	0	3
Segm	84	81	90	80	75	78	79	81	81
Plaq	210	230	12	250	56	260	209	240	165
PT	7	7,5	4,6	7,2	11,2	6,4	7,4	7,1	9
Alb	2,8	2,3	1,9	2,5	2,3	3,2	2	2,9	2,3
Alt	44	18,3	18	14,5	18,3	42,1	12,9	35	9,7
FA	150	145	705	22,4	191,8	71,7	956	145	211,7
Ureia	38,1	30,2	232	32,5	58,1	33,8	22,3	37,5	96,5
Creat	0,93	0,91	2,7	0,62	0,93	0,75	0,98	0,96	1,6
Lactato	2,8	1,1	2	2,4	3	2,5	4,3	2,5	3,8
pH	7,39	7,38	7,19	7,37	7,39	7,31	7,33	7,36	7,33
PvO₂	31	45	34	34	31	53	42	53	55
PvCO₂	35	45	39	34	35	34	47	35	43
HCO₃	20	15	11	19	20	18	17	20	16
SvO₂	53	52	57	61	53	54	55	54	54
BE	-3	-5	-16	-5	-3	-3	-2	-4	-5
TNF-α	8,2	14,1	2	0,58	18,83	12	44,42	0,43	4,13
IL-1β	0,83	4,06	1,2	0	0,25	0,72	0,98	0,02	2,96
IL-6	54,84	0	1067,59	49,55	67,99	5,98	72,37	18,05	283,6
CRP	282	181,4	670	125,2	175,6	120,4	249,7	397,5	449,4

(continuação)

Variável	Animal								
	64	65	66	67	68	69	70	71	72
Idade	5	8	11	15	10	9	9	7	7
Peso	12	7,1	25	6	14	12	6	6	32
Raça	Cocker	Pood	Pas Al	SRD	SRD	SRD	Pood	Pood	Golden
Gene IL-1β	GG	GG	AG	AA	AA	AG	AG	AG	AG
Gravidade	S Gr	S Gr	Sepse	S Gr	Sepse	S Gr	S Gr	S Gr	S Gr
FC	130	180	110	130	140	140	160	160	105
TPC	2	2	1	2	2	2	2	2	2
PAS	150	160	170	140	180	140	170	170	125
PAD	100	90	110	80	100	80	85	80	80
FR	40	44	40	36	36	40	60	60	36
Temp	39	38,4	37,9	39	39	38,9	39	39	39
Glic	82	85	102	89	84	42	60	83	83
Hem	5,4	7,1	6,2	4,6	5,9	6,3	5,8	5,3	5,6
Hg	11,7	15,2	13,4	9,9	12,1	13,2	12,4	11,9	13,5
Ht	34	48	40	29	34	38	38	36	40
Leuc	54,6	8,3	18,22	32,1	27,56	96,5	52,1	26	44,8
Neutr	81	65	87	78	77	81	85	53	82
Bast	1	0	2	3	0	0	5	0	2
Segm	80	65	85	75	77	81	80	53	80
Plaq	278	56	250	324	215	73	103	349	359
PT	6,4	7,1	8,7	6,9	7,5	9,5	7	8	6,7
Alb	2,5	3,1	3	2,5	2,5	3,1	2,3	2,8	2,5
Alt	6,6	20,2	21	20,2	36	13,7	29,8	21,3	14,2
FA	110,2	171,9	69,5	229,3	56	121,3	166,9	38,5	54,8
Ureia	40,8	192,4	29	77,6	39,6	477,6	9,6	33,5	21,8
Creat	0,56	1,8	0,9	2,44	0,93	3,8	0,7	0,74	0,89
Lactato	2,5	4,5	2,6	3,7	3	5	3,2	3,6	4
pH	7,34	7,33	7,37	7,41	7,33	7,29	7,31	7,53	7,33
PvO₂	48	50	60	27	54	32	54	48	44
PvCO₂	37	30	38	30	35	49	34	25	35
HCO₃	17	15	20	18	18	15	18	21	21
SvO₂	56	80	62	46	60	45	51	59	58
BE	-5	-9	0	-5	-1	-10	-6	0	-1
TNF-α	12	1,19	0	0	0	0	0	24,28	1,35
IL-1β	1,07	2,4	0,48	0,42	0,31	4,59	0,13	6,29	0,57
IL-6	726,19	97,15	0	35,7	0	423,6	51,85	183,81	1000,98
CRP	108,3	472	236,3	236,3	123,7	359,8	698,6	234,9	494,8

(continuação)

Variável	Animal								
	73	74	75	76	77	78	79	80	81
Idade	12	12	12	9	8	12	11	5	8
Peso	8,5	16	14	31,6	12	52	2,9	12	20
Raça	York	SRD	SRD	Labra	SRD	Dog AI	Pinsc	SRD	SRD
Gene IL-1β	AG	AA	AG	AG	GG	AG	GG	GG	GG
Gravidade	S Gr	S Gr	S Gr	S Gr	S Gr	S Gr	S Gr	Contr	Sepse
FC	110	125	165	120	140	110	120	110	130
TPC	2	2	2	2	2	2	1	1	2
PAS	150	165	200	160	130	120	160	130	150
PAD	80	90	100	90	75	80	85	75	85
FR	36	40	36	60	44	44	32	36	44
Temp	38,5	39	38,2	38,7	39	38,7	38,5	38	38,1
Glic	98	78	121	126	80	94	48	87	100
Hem	4,5	3,9	2,9	5	6,4	3,4	4,2	7	6,5
Hg	10,2	9,8	6,6	11,8	14,7	6,9	10	13	14,9
Ht	29	28	21	35	41	22	28	44	44
Leuc	6,16	45,6	79,7	28,3	7,54	35,5	7,8	8,5	21,6
Neutr	64	78	80	74	68	79	85	59	75
Bast	0	0	8	0	0	3	0	1	0
Segm	64	78	72	74	68	76	85	58	75
Plaq	140	88	391	168	382	212	170	220	375
PT	6,9	7,2	7,8	7,2	7,1	7,7	5,7	6,8	6,3
Alb	2,7	2,2	2,8	2,3	3,1	1,9	2,2	2,4	3
Alt	12,6	25	16,6	18	23,4	10,5	18	33	45
FA	248,4	154	86,4	114	17,4	71,4	147,2	98	97,5
Ureia	214,7	140	47,9	42	30,7	27,2	143,6	26	28,6
Creat	6,7	1,7	0,86	0,9	0,97	1	0,85	0,8	0,86
Lactato	4	4,1	4,3	3	4,2	3,4	3,7	2	2,5
pH	7,26	7,42	7,4	7,35	7,36	7,41	7,34	7,39	7,36
PvO₂	30	32	27	40	45	27	43	56	45
PvCO₂	31	34	33	38	35	52	45	38	39
HCO₃	13	20	20	21	18	16	14	18	19
SvO₂	44	60	48	45	57	49	52	89	58
BE	-12	-3	-3	-2	-1	-6	-6	-1	-1
TNF-α	10,1	17,96	26,82	0	1,35	24	1,85	0	0,43
IL-1β	0,18	0,88	0,48	6,29	6,24	0,46	1,68	0,7	0,03
IL-6	44,95	10,52	42,75	0	33,37	110,61	1045,2	0	40,34
CRP	412,8	228,9	386,7	289	399,5	569	605,8	0	142,9

(continuação)

Variável	Animal								
	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Idade	4	16	16	16	12	6	7	9	14
Peso	8	8,6	4,6	8,3	11	14	10	5	5
Raça	SRD	Lhasa	SRD	Pood	SRD	SRD	SRD	Maltês	Pood
Gene IL-1β	GG	AG	AG	GG	GG	GG	GG	AA	AG
Gravidade	Contr	Sepse	S Gr	Sepse	Contr	Contr	Contr	Contr	Sepse
FC	120	150	120	110	135	130	110	140	140
TPC	1	3	3	2	1	1	1	2	2
PAS	140	165	140	180	150	130	125	120	170
PAD	80	90	75	100	90	75	85	80	90
FR	36	36	60	36	36	32	28	32	40
Temp	37,8	39	39,9	39	38	37,1	37,5	37,2	38,6
Glic	83	95	44	89	88	91	75	82	70
Hem	6	5,8	5,7	5,6	6,1	7,3	7,4	7	6,5
Hg	14	12,2	11,3	12	15	13	13	14	13,6
Ht	45	36	32	34	48	44	40	42	39
Leuc	10,2	26	1,8	9,61	10	8,4	9,2	7,8	12,07
Neutr	60	87	62	76	60	62	68	70	84
Bast	0	0	4	6	2	0	1	0	1
Segm	60	87	58	70	58	62	67	70	83
Plaq	230	220	668	471	220	350	310	280	484
PT	7	7,3	5,7	7,4	7	6,7	7,2	7,3	7,5
Alb	2,6	3,3	2,9	2,5	3	3,3	3	3,1	3
Alt	26	18,9	93	45	16	37	16	28	50
FA	56	84,7	170,6	135	36	21	85	47	150
Ureia	25	40	105,8	27,3	29	18	29	23	28,6
Creat	0,6	0,8	1,7	0,93	0,6	0,8	0,9	0,6	0,86
Lactato	1,4	2,5	6,3	1,7	1,8	2	1,9	2,1	2,4
pH	7,42	7,4	7,35	7,33	7,4	7,39	7,41	7,4	7,36
PvO₂	64	50	40	54	55	34	51	56	45
PvCO₂	41	40	28	35	35	44	40	38	39
HCO₃	20	20	15	18	20	21	19	20	19
SvO₂	82	65	56	60	78	74	82	81	58
BE	0	0	-9	-1	0	-1	0	0	-1
TNF-α	0	0	0	0	1,52	0	24	5,05	0
IL-1β	3,72	1,38	6,24	0	0,02	0,02	0,3	0,22	0,07
IL-6	0	45,9	142,8	0	0	0	0	0	41,7
CRP	0,35	96,7	378,6	183,1	8,4	3,62	0	12,8	80,7

(Conclusão)

Variável	Animal			
	91	92	93	94
Idade	8	10	5	6
Peso	32	26	36	5
Raça	Labr	SRD	Golden	Maltês
Gene IL-1β	AA	AG	GG	GG
Gravidade	Contr	S Gr	Contr	Contr
FC	95	96	110	100
TPC	2	2	2	1
PAS	115	160	130	150
PAD	75	85	80	90
FR	32	32	36	36
Temp	38	37,6	38	38
Glic	83	65	93	87
Hem	6,1	6,8	6,1	6,1
Hg	15	14,2	15	15
Ht	48	41	48	46
Leuc	7,5	43	10	9,3
Neutr	69	71	58	71
Bast	0	0	2	0
Segm	69	71	56	71
Plaq	230	238	220	300
PT	7	6,4	7	7,2
Alb	2,9	2	3	3,1
Alt	15	14,6	16	25
FA	36	169,4	74	36
Ureia	29	147,8	25	32
Creat	0,6	1,7	0,6	0,9
Lactato	1,9	1,6	1,7	2,1
pH	7,4	7,33	7,36	7,4
PvO₂	55	56	55	60
PvCO₂	35	41	42	35
HCO³	20	14	21	20
SvO₂	78	48	82	71
BE	0	-7	0	0
TNF-α	0	0,58	0	0
IL-1β	0	0,1	0	0,2
IL-6	0	31,04	0	0
CRP	3,1	528,3	3,6	4,2

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

Legenda: DP – desvio padrão da média, SRD – sem raça definida

Apêndice C – Quantidade de lactato sistêmico no trans-operatório e uterino dos animais com piometra
– São Paulo – 2012/2014

Animal	Sistêmico	Uterino
51	3,7	4,8
52	3,9	5,1
53	2,7	3,3
55	4,3	2,8
56	1,1	2,5
58	2,4	6,1
59	3	5,6
61	4,3	6,1
63	3,8	6,3
64	2,5	4
65	4,5	7
66	2,6	3,9
67	3,7	5,2
68	3	4,1
69	5	5,5
70	3,2	4,9
71	3,6	5,8
72	4	5,2
73	4	7,1
74	4,1	5,3
75	4,3	6,7
76	3	5,6
77	4,2	6,3
78	3,4	5,8
81	2,5	3,8
83	2,5	3,6
85	1,7	4,2
90	2,4	4,6
92	1,6	3,5
Média	3,27	4,98
DP	0,95	1,23