

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA (PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

DISSERTAÇÃO

**Estudo Retrospectivo da Relação Neutrófilo-Linfócito e da
Relação Plaqueta-Linfócito como Preditivo e Prognóstico de sepse
em Cadelas com Piometra: 128 Casos (2017-2019)**

José Eduardo Silveira Coutinho

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**ESTUDO RETROSPECTIVO DA RELAÇÃO NEUTRÓFILO-
LINFÓCITO E DA RELAÇÃO PLAQUETA-LINFÓCITO COMO
PREDITIVO E PROGNÓSTICO DE SEPSE EM CADELAS COM
PIOMETRA: 128 CASOS (2017-2019)**

JOSÉ EDUARDO SILVEIRA COUTINHO

Sob Orientação da Professora
Cássia Maria Molinaro Coelho

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ
Setembro de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C871e Coutinho, José Eduardo Silveira, 1990-
Estudo retrospectivo da relação neutrófilo-linfócito e da relação plaqueta-linfócito como preditivo e prognóstico de sepse em cadelas com piometra: 128 casos (2017-2019) / José Eduardo Silveira Coutinho. - Indaiatuba-SP, 2022.
44 f.: il.

Orientadora: Cássia Maria Molinaro Coelho.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de pós-graduação em medicina veterinária, 2022.

1. sepse. 2. inflamação sistêmica. 3. disfunção orgânica. I. Coelho, Cássia Maria Molinaro , 1979-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de pós-graduação em medicina veterinária III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JOSÉ EDUARDO SILVEIRA COUTINHO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25/07/2022

Cassia Maria Molinaro Coelho. Dra. UFRRJ
(Orientadora)

Bruno Ricardo Soares Alberigi da Silva. Dr. UFRRJ

Alexandre José Rodrigues Bendas. Dr. UFRRJ

Andresa Guimarães. Dra. UFRRJ



Emitido em 2023

TERMO N° 980/2023 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)

(N° do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 28/08/2023 10:17)

ALEXANDRE JOSE RODRIGUES BENDAS

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptMCV (12.28.01.00.00.00.00.53)

Matrícula: ###200#0

(Assinado digitalmente em 28/08/2023 10:26)

ANDRESA GUIMARAES

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptMCV (12.28.01.00.00.00.00.53)

Matrícula: ###244#9

(Assinado digitalmente em 28/08/2023 20:24)

BRUNO RICARDO SOARES ALBERIGI DA SILVA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptMCV (12.28.01.00.00.00.00.53)

Matrícula: ###518#7

(Assinado digitalmente em 28/08/2023 10:50)

CASSIA MARIA MOLINARO COELHO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptMCV (12.28.01.00.00.00.00.53)

Matrícula: ###101#2

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **980**, ano: **2023**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **28/08/2023** e o código de verificação: **31fb35bbd3**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser o meu refúgio e a minha proteção.

Agradeço aos meus pais, José Arnaldo e Marina, pelo presente da vida e por dedicarem todos os seus esforços à minha criação e à de meus irmãos. Não há palavras para agradecê-los!

Agradeço aos meus irmãos, por saber que, mesmo distantes fisicamente, podemos contar uns com os outros.

Agradeço ao meu sobrinho Bernardo, pela alegria que seu sorriso me traz.

Agradeço aos meus avós, Beatriz, Décio, Paulo, Heloísa e Leda, por todo o carinho e pelo exemplo.

Aos meus amigos, pelas risadas e por fazerem a vida mais leve.

Agradeço aos meus professores, especialmente a Profa Cássia, por compartilhar seus conhecimentos e dedicar seu tempo à execução deste trabalho.

Gostaria de agradecer meu primo, Ricardo, por ter me apresentado o maravilhoso mundo da medicina veterinária.

Agradeço a todos os meus pacientes e seus familiares, os quais representam os motivos da minha busca pelo aprimoramento profissional. É pelo bem-estar de vocês!

Agradeço a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, minha segunda casa, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

COUTINHO, José Eduardo Silveira. **Estudo retrospectivo da relação neutrófilo-linfócito e da relação plaqueta-linfócito como preditivo e prognóstico de sepse em cadelas com piometra: 128 casos (2017-2019)**. 2022. 33f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia e Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

A piometra é caracterizada como um processo infeccioso supurativo uterino e que apresenta alta incidência em cadelas. Sua ocorrência frequentemente determina o desenvolvimento de sepse, a qual, por sua vez, é definida como uma síndrome grave que envolve disfunção orgânica decorrente de uma resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção. O diagnóstico e determinação prognóstica da sepse representam importante desafio em Medicina Veterinária, devido a falta de marcadores específicos. A Relação Neutrófilo-linfócito (RNL) e a Relação Plaqueta-linfócito (RPL) são duas relações que têm demonstrado resultados promissores como biomarcadores desta síndrome em humanos. O objetivo deste estudo retrospectivo foi avaliar a utilidade destas relações como ferramentas auxiliares ao diagnóstico e de predição de desfecho na sepse em cadelas com piometra. A partir da revisão dos prontuários do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, foram admitidas cadelas saudáveis como grupo controle (C, n=95) e cadelas diagnosticadas com piometra (grupo P, n=128). As cadelas com piometra foram sublocadas nos subgrupos “sem sepse” (PO, n=26), “com sepse” (PS, n=102), “sobreviventes de sepse” (SS, n=90) e “grupo óbito” (SN, n=12). Variáveis epidemiológicas (idade e porte), laboratoriais (leucócitos totais, neutrófilos segmentados, neutrófilos bastonetes, linfócitos e plaquetas), RNL, RPL e número de disfunções orgânicas foram comparados entre os grupos (C vs P; PO vs PS; SS vs SN). Análises de Curva ROC (*Receiver-Operating Characteristics*) foram realizadas para a determinação da acurácia das variáveis para diagnóstico de sepse e para a predição do desfecho de óbito. Análises de regressão logística binária foram realizadas para verificar a associação das variáveis aos diferentes desfechos. A idade diferiu apenas entre os grupos C e P. Os valores de RNL foram demonstrados mais elevados apenas nas cadelas com piometra em comparação às saudáveis. A RPL, por sua vez, apresentou reduções dos valores nas cadelas com piometra (C vs P) e nas com sepse (PO vs PS). Ambas as relações não foram úteis para o diagnóstico de sepse e predição de óbito pela síndrome nas cadelas portadoras desta afecção. O número de disfunções orgânicas foi demonstrado importante preditor e com alta associação ao óbito por sepse nas cadelas com piometra. Concluiu-se que a RNL e a RPL não representam ferramentas úteis ao diagnóstico de sepse e predição de óbito em cadelas com piometra.

Palavras-chave: sepse, inflamação sistêmica, disfunção orgânica

ABSTRACT

COUTINHO, José Eduardo Silveira. **Retrospective investigation of the neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in bitches with pyometra: 128 cases (2017-2019)**. 2022. 33f. Dissertation (Master of Veterinary Medicine, Pathology and Clinical Sciences). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Pyometra is characterized as a uterine suppurative infectious process that has a high incidence in bitches. Its occurrence often determines the development of sepsis, which is defined as a severe syndrome that involves organ dysfunction resulting from a dysregulated host response to an infection. The diagnosis and prognostic determination of sepsis represent an important challenge in veterinary medicine, due to the lack of specific biomarkers. The Neutrophil-to-lymphocyte Ratio (NLR) and the Platelet-to-lymphocyte Ratio (PLR) are two ratios that have shown promising results as biomarkers of this syndrome in humans. The objective of this retrospective study was to evaluate the usefulness of these ratios as auxiliary tools for diagnosis and outcome prediction in sepsis in bitches with pyometra. By reviewing the medical records of the Veterinary Hospital of the Federal Rural University of Rio de Janeiro, healthy bitches were admitted as a control group (C, n=95) and of bitches diagnosed with pyometra as case group (P group, n=128). The bitches with pyometra were suballocated in the subgroups “without sepsis” (PO, n=26), “sepsis” (PS, n=102), “survivors of sepsis” (SS, n=90) and “non-survivors” (SN, n=12). Epidemiological variables, laboratory variables (total leukocytes, segmented neutrophils, band neutrophils, lymphocytes and platelets), NLR, PLR and number of organ dysfunctions were compared between groups (C vs P; PO vs PS; SS vs SN). Receiver-Operating Characteristics (ROC) curve analyzes were performed to determine the accuracy of the variables for diagnosing sepsis and predicting the outcome of death. Binary logistic regression analyzes were performed to verify the association of variables with different outcomes. Age differed only between C and P groups. NLR values were shown to be higher only in bitches with pyometra compared to healthy ones. The PLR, in turn, showed reductions in the values in bitches with pyometra (C vs P) and in those with sepsis (PO vs PS). These relationships were not useful for diagnosing sepsis and predicting death in bitches with this condition. The number of organ dysfunctions was shown to be an important predictor of sepsis and was highly associated with this outcome in bitches with pyometra. It was concluded that the NLR and the PLR do not represent useful tools for the diagnosis of sepsis and prediction of death in bitches with pyometra.

Key-words: sepsis, systemic inflammation, organic dysfunction

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO I – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
1 PIOMETRA	3
2 INFLAMAÇÃO E SEPSE.....	4
3 BIOMARCADORES SANGUÍNEOS NA SEPSE: NEUTRÓFILOS, LINFÓCITOS E PLAQUETAS	6
4 RELAÇÕES NEUTRÓFILO-LINFÓCITO E PLAQUETA-LINFÓCITO	8
5 JUSTIFICATIVA	11
6 REFERÊNCIAS.....	12
CAPÍTULO II – Utilidade da relação neutrófilo-linfócito e da relação plaqueta-linfócito como biomarcadores da sepse em cadelas com piometra¹	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS	24
DISCUSSÃO	26
CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS.....	29

INTRODUÇÃO

A piometra é uma afecção caracterizada por um processo infeccioso supurativo do útero que apresenta alta incidência em cadelas de meia-idade. Sua ocorrência determina frequentemente o desenvolvimento de uma resposta inflamatória moderada a intensa que, se não controlada, pode desencadear um mecanismo fisiopatológico de inflamação sistêmica exacerbada (SIRS), disfunção endotelial vascular, hipoperfusão tecidual e consequente disfunção de órgãos e sistemas – a sepse. Atualmente se reconhece que, independente da origem da infecção, somente o fato do paciente desenvolver sepse aumenta significativamente a morbidade, custos do tratamento, qualidade de vida a curto e longo prazo e obviamente, a mortalidade. Estas implicações já estão bem descritas em humanos e nas espécies de animais domésticos, como cães, gatos e equinos.

Estudos realizados em humanos e animais destacam a grande incidência da sepse em processos infecciosos e que, quanto mais precoce o diagnóstico da síndrome, maiores são as chances de sobrevivência. Desta forma, grandes esforços estão dedicados a ferramentas de diagnóstico – um grande desafio, pois a sepse, sendo um conjunto de sinais e sintomas inespecíficos, dificilmente apresentará um exame de excelente sensibilidade e especificidade para ser indicado como “padrão-ouro”. Soma-se a esta complexidade as características inerentes a espécie do paciente e infecção preexistente. De acordo com o último Consenso sobre sepse em humanos, publicado em 2016, a identificação e estratificação das principais disfunções orgânicas (cardiovascular, renal, hepática, respiratória, neurológica e hemostática), determinado pelo escore *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA), apresenta evidências diagnósticas superiores ao uso do escore SIRS para determinar a sepse e prever desfecho de um paciente. Ainda assim, biomarcadores inflamatórios como proteínas de fase aguda e índices de células sanguíneas são utilizados como ferramentas complementares de diagnóstico e prognóstico em cenários ambulatoriais, emergência e UTI, a fim de auxiliar o clínico na tomada de decisão. Uma vez que toda a dinâmica da sepse se inicia com uma resposta inflamatória exacerbada a um foco infeccioso, existe um potencial desses biomarcadores em prever gravidade e desfecho no paciente séptico.

Neste contexto observa-se que a Relação Neutrófilo-Linfócito (RNL) e a Relação Plaqueta-Linfócito (RPL) são razões entre células sanguíneas inflamatórias com dinâmica diretamente ou inversamente proporcional em afecções infecciosas, inflamatórias e neoplásicas.

Apresentam alta aplicabilidade no cenário clínico por serem de fácil realização e baixo custo, uma vez que são determinadas a partir de um exame de rotina – o hemograma. Em humanos, a RNL e a RPL têm demonstrado valor diagnóstico e de determinação prognóstica nas áreas de cardiologia, oncologia, em afecções inflamatórias e na sepse. Em cães, estes biomarcadores têm sido estudados principalmente em afecções neoplásicas e inflamatórias, de causa infecciosa ou não, com resultados promissores à sua aplicabilidade clínica. Estudos sobre a possível utilidade da RNL e da RPL como biomarcadores na sepse canina são escassos, e a aplicabilidade destas relações permanece incerta para tal. Sendo a piometra uma afecção de alta incidência na rotina clínica e importante causadora de sepse na espécie canina, hipotetiza-se que o uso da RNL e RPL pode ser ferramenta de diagnóstico e prognóstico de cadelas com suspeita de piometra e sepse, auxiliando o clínico na tomada de decisão em cenários de poucos recursos.

CAPÍTULO I – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1 PIOMETRA

A piometra é uma afecção reprodutiva caracterizada por um processo infeccioso bacteriano supurativo do útero, de ocorrência comum em cadelas de meia-idade (EGENVALL et al., 2001; HAGMAN et al., 2011; JITPEAN et al., 2012; HAGMAN, 2018). A fisiopatogenia da piometra se desenvolve a partir da exposição uterina crônica à progesterona, o que leva a espessamento endometrial e acúmulo de secreção uterina, denominada hiperplasia endometrial cística (PRETZER, 2008). Nesta condição, o ambiente uterino se torna favorável a aderência, colonização e crescimento bacteriano oportunista, principalmente na fase do estro, quando a cérvix está aberta (DE BOSSCHERE et al., 2001). O patógeno mais comumente isolado dos casos de piometra em cadelas é *Escherichia coli* (COGGAN et al., 2008). A piometra pode ser classificada clinicamente como de cérvix aberta ou fechada, de acordo com a presença de descarga vaginal (JITPEAN et al., 2016; HAGMAN, 2022). O fato da cérvix estar fechada e não permitir a liberação da secreção vaginal é descrita por alguns autores como fator relacionado a maior gravidade (JITPEAN et al., 2016; PRASAD et al., 2017), o que, no entanto, permanece controverso, por terem sido demonstrados resultados conflitantes em outros estudos (VOLPATO, 2011; UÇMAK et al., 2021). Independente da apresentação clínica, a afecção pode determinar, além da morbidade, risco de vida para o paciente, sendo relatada na literatura até 10% de mortalidade (EGENVALL et al., 2001; KUMARI BAITHALU et al., 2010; JITPEAN et al., 2014).

O diagnóstico da piometra é determinado por alterações ultrassonográficas, tais como cornos uterinos aumentados e com conteúdo hipo e/ou anecogênico, espessamento e hiperecogenicidade das paredes uterinas, e irregularidade endometrial (AGURTO et al., 2001; SCHÄFER-SOMI, 2015). Ainda assim, afecções como mucometra, hidrometra e hemometra apresentam achados de imagem similares, constituindo importante diagnóstico diferencial não infeccioso (PRETZER, 2008). Reconhecendo que o padrão-ouro para a determinação da piometra se dá por meio da inspeção direta e avaliação histopatológica do útero, e que tal procedimento só será possível após a remoção do foco infeccioso (ovariohisterectomia), o clínico deve reconhecer sinais clínicos e biomarcadores inflamatórios diretos e indiretos que auxiliem na identificação do processo infeccioso (HAGMAN et al., 2006; HAGMAN, 2022). Cadelas com piometra apresentam comumente um aumento significativo de endotoxinas no

plasma sanguíneo, os quais são responsáveis pelos efeitos sistêmicos observados na afecção, devido a indução da liberação de fatores inflamatórios (HAGMAN et al., 2006) – o que pode culminar em Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) (HAGMAN, 2012), e, consequentemente, em sepse (SALOMÃO et al., 2019).

2 INFLAMAÇÃO E SEPSE

A Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica se caracteriza por um estado inflamatório disseminado sistemicamente, devido a uma resposta imunológica descontrolada frente a um processo de injúria local, de origem infecciosa ou não (SHRESTHA; KUMAR, 2018). Seu desenvolvimento tem como principal desencadeante o sistema imune inato, que reconhece sinais provenientes do agente infeccioso ou do próprio hospedeiro por meio dos chamados receptores de reconhecimento de padrões (ex. receptores *toll-like*) (TSUJIMOTO et al., 2008). Tais receptores são determinantes para a produção excessiva e desbalanceada de mediadores inflamatórios, principalmente citocinas, tais como interleucina-6, interleucina-8, interleucina-10, interleucina-18 e fator de necrose tumoral (CHAUDHRY et al., 2013; WIERSINGA et al., 2014).

Além das citocinas, fatores como prostanóides, fator ativador de plaquetas e moléculas liberadas das células danificadas (como o ATP) intensificam, perpetuam e retroalimentam a fisiopatogenia do processo (EVANS, 2018). Concomitantemente ao estado pró-inflamatório pode ocorrer atuação desregulada de mecanismos anti-inflamatórios e imunossupressão (paralisia imune), por meio da depleção de células T (HOTCHKISS et al., 2013) e a ação de citocinas imunossupressoras (ONO et al., 2018; WANG et al., 2018; SENOUSY et al., 2022) com importante impacto sobre a morbidade e mortalidade (VAN TON et al., 2018).

A progressão e intensificação da cascata inflamatória frequentemente determina consequências para a função celular, endotélio vascular, tecidual e orgânica – reconhecida como disfunção orgânica associada a SIRS ou sepse (BIRADAR; MORAN, 2011). Desta forma o conceito de sepse se refere a síndrome que envolve disfunção orgânica decorrente de uma resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção (SINGER et al., 2016).

A sepse pode se manifestar a partir de qualquer processo infeccioso e determinar maior morbidade, sequelas de médio a longo prazo e prognóstico desfavorável *per se* (GOTTS; MATTHAY, 2016), representando uma das principais causas de mortalidade no mundo (DUGANI et al., 2017). O choque séptico é definido como estágio de agravamento da sepse,

no qual ocorre hipotensão arterial apesar da realização de reanimação volêmica (SINGER et al., 2016).

O critério de diagnóstico da SRIS em cães é definido pela presença de duas ou mais alterações, a saber: temperatura retal <38 ou $>39,2$ °C, frequência cardíaca >120 bpm, frequência respiratória >20 mpm, leucometria global $<6 \times 10^3$ ou $>16 \times 10^3$, ou a presença de neutrófilos bastonetes $>3\%$ (HAUPTMAN et al., 1997). Este critério, associado a presença de um foco infeccioso, foi por décadas reconhecido em humanos como diagnóstico para a sepse (BONE et al., 1992; LEVY et al., 2003). Entretanto, com a evolução do conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos da sepse e o entendimento de que a síndrome vai além da presença de inflamação sistêmica exacerbada associada a infecção, novos critérios foram propostos no consenso *Sepsis-3*.

Um escore diagnóstico baseado na presença de disfunção orgânica denominado *Sepsis-related Organ Failure System* (SOFA) passou a ser preconizado para a prática clínica (VINCENT et al. 1998; SINGER et al., 2016). O escore utiliza marcadores de disfunção em seis sistemas corporais: respiratório, hemostático, hepático, cardiovascular, renal e nervoso (SINGER, 2016). O escore SOFA, no entanto, não possui validação para uso na espécie canina, bem como não há consenso sobre a síndrome sepse em medicina veterinária. Diante disso, Castro & Rabelo (2017), em uma análise do consenso *Sepsis-3*, propuseram a utilização de um algoritmo adaptado para o diagnóstico da sepse em cães, baseado na presença de disfunção orgânica, com a utilização dos seguintes marcadores: escala de coma de Glasgow, pressão arterial sistólica, débito urinário, creatinina sérica, oximetria, contagem de plaquetas, fibrinogênio, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, D-dímero, ausculta abdominal e lactato sanguíneo. Destaca-se, no entanto, que o rápido diagnóstico da sepse interfere substancialmente sobre o desfecho clínico individual (OPAL; WITTEBOLE, 2020) e que, assim como na medicina, alguns dos marcadores de disfunção orgânica propostos podem apresentar limitações relacionadas ao tempo de obtenção de resultado (SINGER et al., 2016), e à disponibilidade, especialmente em medicina veterinária.

Diversos outros biomarcadores já foram estudados para utilização na sepse. Eles podem ser divididos em predição do risco, diagnóstico, monitoramento e desfecho (SANDQUIST; WONG, 2014; PIERRAKOS et al., 2020). Nesse grupo de marcadores, podemos destacar o sucesso de algumas, como a procalcitonina (TROIA et al., 2018) e a Proteína C-Reativa (PCR) (GEBHARDT et al., 2009), mas elas apresentam elevado custo e não são compatíveis para uso na rotina clínica. E sobre este cenário é importante ressaltar que, mesmo na medicina e

principalmente na medicina veterinária, a exequibilidade e o custo são tão importantes quanto a sensibilidade e especificidade de um teste, fazendo-se necessários estudos com marcadores acessíveis e de rápida obtenção de resultado para utilização em animais.

3 BIOMARCADORES SANGUÍNEOS NA SEPSE: NEUTRÓFILOS, LINFÓCITOS E PLAQUETAS

Os leucócitos e as plaquetas são as principais células sanguíneas envolvidas na resposta inflamatória e que são mensurados rotineiramente, no hemograma (SCOTT; STOCKHAM, 2013), em qualquer cenário prático devido ao baixo custo e facilidade de execução. Os neutrófilos são a primeira linha de defesa do sistema imune inato e representam células essenciais para a defesa contra agentes infecciosos (RICHE et al., 2015). Após a migração ao tecido alvo, os neutrófilos respondem aos patógenos por meio de fagocitose e liberação de substâncias com atividade antimicrobiana (SÔNEGO et al., 2016).

A seps induz alterações da função dos neutrófilos, os quais passam a agir de maneira inefetiva no combate ao processo infeccioso e induzir danos ao hospedeiro (RESENDE et al., 2020). Estudos demonstram um retardo de sua apoptose (TAMAYO et al., 2012) e, concomitantemente, redução da atividade fagocitária e antimicrobiana, associados a uma supressão da imunidade adaptativa (LEWIS et al., 2012; HODGSON et al., 2018). A redução da apoptose dos neutrófilos é um importante mecanismo de desenvolvimento de neutrofilia na seps e que, juntamente com a redução da capacidade de fagocitose, se associa a piores desfechos nos doentes sépticos (RESENDE et al., 2020).

Além disso, observa-se um fenômeno chamado “paralisia de neutrófilos”, onde os receptores expressos na superfície celular e responsáveis pela quimiotaxia e migração para o sítio de infecção são dessensibilizados, com consequente falha nestes processos (SÔNEGO et al., 2016). A ativação sistêmica dos receptores *toll-like* dos neutrófilos induzida pela inflamação sistêmica resulta na expressão de receptores que culminam em migração destas células a órgãos não relacionados ao sítio de infecção, o que resulta em dano tecidual, contribuindo para o desenvolvimento de disfunção orgânica (BROWN et al., 2006).

Os linfócitos representam as principais células de defesa do sistema imune adaptativo, e importantes componentes no combate a infecções (OLSEN SARAIVA CÂMARA et al., 2012). Se diferenciam em linfócitos tipo TCD4, TCD8 e B, com funções que vão da neutralização de patógenos por meio de anticorpos específicos à ativação de macrófagos e ação citotóxica direta (FLEISHER; BOSCO OLIVEIRA, 2004).

A sepse determina, nos estados imunossupressivos, perdas de todos os tipos linfocitários, com consequente ocorrência de linfopenia (HODGSON et al., 2018). A linfopenia da sepse ocorre pelo aumento da apoptose linfocitária, estimulada pela inflamação não resolvida (LEWIS et al., 2012) e representa importante causa do estado imunossupressivo da síndrome (DREWRY et al., 2014). Em humanos com sepse, estudos já demonstraram a associação da linfopenia a maus desfechos clínicos (HOTCHKISS et al., 1999; GIRARDOT et al., 2017). Em cães também já foi demonstrada a ocorrência de linfopenia em pacientes com sepse (WALTERS et al., 2017), porém são escassos os estudos acerca de suas consequências sobre o prognóstico desta condição. O estudo de Bartoskova e colaboradores (2007) com cadelas com piometra demonstrou que a ocorrência de linfopenia e alterações da função linfocitária se dá de maneira diretamente proporcional à gravidade da doença, acometendo especialmente pacientes com pior estado clínico e os acometidos pela sepse.

As plaquetas são fragmentos celulares reconhecidos principalmente pelo papel que desempenham na hemostasia (BROOS et al., 2011; HOLINSTAT, 2017; SANG et al., 2021). Evidências recentes demonstram que as plaquetas sejam também estruturas dotadas de aparatos com importante função em coordenar direta e indiretamente a inflamação e resposta imune, tanto inata quanto adaptativa (GROS et al., 2015; THOMAS; STOREY, 2015; DEWITTE et al., 2017; SONMEZ; SONMEZ, 2017; VARDON-BOUNES et al., 2019; CHEN et al., 2020). As funções imunológicas reconhecidas das plaquetas são: liberação de mediadores inflamatórios e reconhecimento de microrganismos patogênicos (CHEN et al., 2020), regulação da permeabilidade vascular (GROS et al., 2015), formação de pontes com os leucócitos para a diapedese (THOMAS; STOREY, 2015) e a liberação de fatores de quimiotaxia (SONMEZ; SONMEZ, 2017).

Quando da ocorrência de sepse, diferentes dinâmicas plaquetárias têm sido descritas, sendo relatadas elevações (SHEN et al., 2019) e, principalmente, reduções de suas contagens nos doentes (KENNEY et al., 2010; GHIMIRE et al., 2021). A trombocitopenia da sepse resulta principalmente de redução da produção plaquetária, hemodiluição, consumo plaquetário, aumento do sequestro em microvasos e destruição imunomediada de plaquetas (VARDON-BOUNES et al., 2019). Em humanos, estudos tem implicado a trombocitopenia como um sinal que deve ser seriamente considerado na sepse, e com valor preditivo de óbito (SAYED et al., 2020; GHIMIRE et al., 2021; GIUSTOZZI et al., 2021) e da ocorrência de eventos adversos (CLAUSHUIS et al., 2016; BOSCOLO et al., 2020). Tal associação a maus desfechos é atribuída a sua relação com o desenvolvimento de Coagulação Intravascular Disseminada

(CID), condição esta considerada de extrema gravidade (GIUSTOZZI et al., 2021). A ocorrência de trombocitopenia na sepse canina também é de ocorrência frequente (KENNEY et al., 2010; SMITH et al., 2014). O estudo de Kenney e colaboradores (2010) demonstrou que a disfunção hemostática, identificada pelas baixas contagens plaquetárias e/ou alterações de coagulograma, representa a mais comum das disfunções orgânicas na sepse canina, e com impacto negativo sobre a probabilidade de óbito dos pacientes. Em cadelas com piometra, a trombocitopenia também é de ocorrência comum devido a ação de endotoxinas bacterianas e pode afetar negativamente o prognóstico (PLAVEC et al., 2006). Devido ao envolvimento das plaquetas no processo inflamatório, a elevação de suas contagens associadas ao estado de inflamação sistêmica da sepse pode ocorrer (NEUMANN, 2021), o que pode ser considerado marcador da gravidade de tal processo e já foi associado a piores desfechos em humanos com sepse (SHEN et al., 2019). Contudo, são escassos os estudos demonstrando tal dinâmica plaquetária em pacientes com sepse.

4 RELAÇÕES NEUTRÓFILO-LINFÓCITO E PLAQUETA-LINFÓCITO

A realização de cálculos de relações entre as células sanguíneas mensuradas no hemograma têm demonstrado a possibilidade de obtenção de informações adicionais relevantes ao diagnóstico (KAHRAMANCA et al., 2014; BAKACAK et al., 2016; LIU et al., 2020), e prognóstico de afecções de diversas etiologias (GUO et al., 2015; CASSIDY et al., 2017; DJORDJEVIC et al., 2018; KIM et al., 2018; MESHAAL et al., 2019; WANG et al., 2020), sem o acréscimo de custos e de equipamentos laboratoriais adicionais. Dentre tais relações têm se destacado a Relação Neutrófilo-linfócito e a Relação Plaqueta-linfócito, tanto para uso em seres humanos quanto na espécie canina (MACFARLANE et al., 2016; HUANG et al., 2020; PIERINI et al., 2020; NEUMANN, 2021; KRIPLANI et al., 2022).

Tais relações são calculadas de forma simples, por meio da divisão das contagens de neutrófilos totais (para a RNL) ou de plaquetas (para a RPL) pelas contagens de linfócitos (DURMUS et al., 2015; KOH et al., 2015). Dessa forma, devido aos papéis dos neutrófilos e das plaquetas no processo de inflamação sistêmica, e da importância dos linfócitos para a imunidade adaptativa, o resultado destes cálculos permite a avaliação do equilíbrio entre os níveis inflamatórios e a capacidade de combate a agentes infecciosos pelo sistema imune adaptativo (TEMPLETON et al., 2014; SHEN et al., 2019; ZENG et al., 2019; ZHANG et al., 2021).

Não há, contudo, valores de referência de RNL e de RPL para seres humanos e para cães disponíveis na literatura científica até então, e a maioria dos estudos demonstra que a aplicabilidade destas relações ocorre principalmente dentro de contextos clínicos específicos pré-estabelecidos e especialmente para a determinação prognóstica e estratificação da gravidade das afecções (DE JAGER et al., 2012; BAKACAK et al., 2016; ZHU et al., 2017; LI et al., 2017; DRĂGOESCU et al., 2022).

Em seres humanos, a RNL e a RPL são estudadas, principalmente, nas áreas de oncologia e cardiologia. Dentre as importantes aplicabilidades já demonstradas destes biomarcadores nestas áreas, cita-se: possibilidade da predição de malignidade de tumores (BAKACAK et al., 2016), acompanhamento clínico de portadores de neoplasias antes e durante o seu tratamento (CASSIDY et al., 2017; ZHANG et al., 2018; HUSZNO; KOLOSZA, 2019) determinação de prognóstico em pacientes oncológicos (ZHU et al., 2017), determinação de sobrevida e risco de mortalidade em cardiopatas (LI et al., 2017; KIM et al., 2018) detecção de hipertrofia ventricular esquerda em hipertensos (ABDULMECIT et al., 2019) e predição do desenvolvimento de insuficiência cardíaca em cardiopatas (DURMUS et al., 2015).

Na espécie canina, a RNL também tem sido estudada na área de oncologia com resultados promissores. Um estudo preliminar com cães portadores de tumores de orofaringe demonstrou a possibilidade de avaliação da resposta inflamatória sistêmica e, portanto, do grau de atividade clínica da neoplasia por meio das mensurações desta relação (REJEC et al., 2017). Foi demonstrada, também em cães, a utilidade da RNL para o diagnóstico de sarcoma de tecidos moles em lesões suspeitas, previamente à excisão para exame histopatológico (MACFARLANE et al., 2016). Entretanto, como ferramenta de determinação prognóstica, a RNL falhou em estudos com cães portadores de melanoma oral (CAMERINO et al., 2021) e de linfoma multicêntrico (MUTZ et al., 2015).

O papel destes biomarcadores também tem sido estudado em doenças primariamente inflamatórias, de causa infecciosa ou não, em seres humanos e em cães (KAHRAMANCA et al., 2014; ŞEREFLICAN et al., 2016; SENG et al., 2018; ABAZA et al., 2019; PIERINI et al., 2019; LIU et al., 2020). Em humanos, se demonstrou a possibilidade de predição de maus desfechos de pacientes com pneumonia por meio das elevações da RNL (DE JAGER et al., 2012). Em cães, contudo, para esta mesma afecção, um estudo com a RNL falhou em demonstrar sua utilidade para a determinação prognóstica na espécie (CONWAY et al., 2021). Em ambas as espécies a RNL se demonstrou útil para a avaliação da gravidade e predição da resposta ao tratamento em enteropatias crônicas (BENVENUTI et al., 2020; BECHER et al.,

2021). Tanto a RNL quanto a RPL foram demonstradas como opções úteis ao diagnóstico da apendicite aguda em humanos, principalmente quando da impossibilidade de confirmação radiológica da doença. A RNL se demonstrou útil também na diferenciação entre apendicite simples e complicada, o que auxilia a priorização cirúrgica de pacientes graves (KAHRAMANCA et al., 2014; LIU et al., 2020). Hodgson e colaboradores (2018), demonstraram que cães com peritonite apresentam elevações da RNL quando comparados a animais saudáveis, enfatizando a associação do biomarcador a inflamação sistêmica na espécie. De modo semelhante, foi demonstrada a ocorrência de elevações da RNL e da RPL em cães e gatos com pancreatite e o papel preditor de maior tempo de hospitalização destes biomarcadores nesta afecção (NEUMANN, 2021).

Para a sepse, especificamente, diversos estudos tem demonstrado a utilidade da RNL e da RPL para o diagnóstico e prognóstico em humanos. Em 2021, Drăgoescu e colaboradores fizeram um estudo com 114 pacientes humanos com sepse e choque séptico e demonstraram a ocorrência de elevações da RNL nestes, e sua correlação com os valores do escore SOFA, sugerindo sua possível aplicação como marcador alternativo e mais acessível da severidade da afecção (DRĂGOESCU et al., 2022). Também como marcador prognóstico, a RNL foi demonstrada mais elevada em pacientes que vieram a óbito por sepse, e com significância estatística para a probabilidade de tal desfecho em seres humanos (LIU et al., 2016).

Os resultados do estudo de Huang e colaboradores (2020), em meta-análise incluindo nove estudos sobre o tema, com 1371 pacientes, corroboraram a utilidade da RNL como marcador prognóstico da sepse, demonstrando a ocorrência de elevação de seus valores em não-sobreviventes em comparação aos de sobreviventes, e sua associação a maus prognósticos (HUANG et al., 2020). A PLR, por sua vez, também teve suas elevações no exame de admissão de pacientes humanos com sepse demonstrada como associada a significativa maior probabilidade de mortalidade, sugerindo sua possível aplicabilidade prognóstica (SHEN et al., 2019).

Um estudo demonstrou a possibilidade de identificação precoce de SRIS e sepse em humanos submetidos a nefrolitotomia por meio das elevações de RNL e de RPL, e propôs valores de corte para ambas as relações, a partir dos quais tais pacientes devem ser monitorados para a ocorrência de complicações relacionadas a infecções (KRIPLANI et al., 2022). Há, contudo, estudos com resultados controversos. Taşkın e colaboradores (2022), num estudo com neonatos humanos, não observaram associação entre os valores de RNL e de RPL a estágios

precoces do desenvolvimento de sepse e demonstraram ausência de significância diagnóstica destes marcadores para a identificação precoce da síndrome (TAŠKLIN et al., 2022).

Em cães, dois estudos foram realizados com o objetivo de avaliação do potencial da RNL e da RPL como biomarcadores na sepse. Hodgson e colaboradores (2018) demonstraram elevações dos valores de RNL na sepse canina, quando comparados aos valores de cães com SRIS e cães saudáveis, entretanto, não sendo alcançada acurácia diagnóstica da relação para utilização prática. O outro estudo, por sua vez, demonstrou resultados conflitantes aos do anterior, sendo demonstradas reduções significativas dos valores de RNL de cães sépticos comparados aos valores de cães com SRIS. Este mesmo estudo demonstrou, ainda, a possibilidade de predição de mortalidade em cães com sepse através das mensurações seriadas da RPL (PIERINI et al., 2020).

Cabe salientar, contudo, que os estudos disponíveis na literatura científica sobre a RNL e a RPL na sepse canina, assim como alguns dos estudos em humanos apresentados no presente trabalho, basearam o diagnóstico de sepse em critérios antigos, e não na presença de disfunção orgânica, conforme proposto mais recentemente por Singer e colaboradores (2016). Considera-se, também, que devido à escassez de estudos acerca do tema, permanece desconhecido o real potencial destes biomarcadores na sepse canina, sendo necessárias maiores investigações, baseadas em critérios clínicos atualizados sobre a sepse para tal elucidação.

5 JUSTIFICATIVA

Justifica-se o presente estudo pela necessidade do estabelecimento de marcadores diagnósticos e prognósticos acessíveis e de baixo custo para a sepse em cães, uma vez que esta representa condição médica com importante incidência e mortalidade na espécie, e frente aos resultados promissores que têm sido demonstrados para o emprego da RNL e da RPL para tal finalidade na espécie humana e em outras afecções com envolvimento inflamatório em cães.

6 REFERÊNCIAS

- ABAZA, N. M.; EL-LATIF, E. M. A.; GHEITA, T. A. Clinical Significance of Neutrophil/lymphocyte Ratio in Patients With Granulomatosis With Polyangiitis. **Reumatologia Clinica**, v. 15, n. 6, 363-367, 2019.
- ABDULMECIT, A. *et al.* Neutrophil to Lymphocyte Ratio as a Predictor of Left Ventricular Hypertrophy in Patients with Newly Diagnosed Hypertension. **Journal of Hypertension and Management**, v. 5, n. 2, 2019.
- AGURTO, H. *et al.* Técnica del estudio ecográfico para el diagnóstico de piometra en caninos. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 12, n. 1, 2001.
- BAKACAK, M. *et al.* Utility of preoperative neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios to distinguish malignant from benign ovarian masses. **Journal of the Turkish German Gynecology Association**, v. 17, n. 1, 21-25, 2016.
- BARTOSKOVA, A. *et al.* Hysterectomy leads to fast improvement of haematological and immunological parameters in bitches with pyometra. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 10, 564-568, 2007.
- BECHER, A. *et al.* Blood neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) as a diagnostic marker in dogs with chronic enteropathy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 33, n. 3, 516-527, 2021.
- BENTLEY, A. M. *et al.* Alterations in the hemostatic profiles of dogs with naturally occurring septic peritonitis. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 23, n. 1, 14-22, 2013.
- BENVENUTI, E. *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in canine inflammatory bowel disease (IBD). **Veterinary Sciences**, v. 7, n. 3, 2020.
- BIRADAR, V.; MORAN, J. SIRS, Sepsis and Multiorgan Failure. *In*: FITRIDGE, R.; THOMPSON, M. **Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists**. Australia: Barr Smith Press, 2011. p.315-331.
- BONE, R. C. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**, v. 101, n. 6, 1644-1655, 1992.
- BOSCOLO, A. *et al.* Whole-blood hypocoagulable profile correlates with a greater risk of death within 28 days in patients with severe sepsis. **Korean Journal of Anesthesiology**, v. 73, n. 3, p. 224-231, 2020.
- BOYLE, P.; FERLAY, J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. **Annals of Oncology**, v. 16, n. 3, p. 481-488, 2005.
- BROOS, K. *et al.* Platelets at work in primary hemostasis. **Blood Reviews**, v. 25, n. 4, 155-167, 2011.

BROWN, K. A. *et al.* Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **Lancet**, v. 368, 157-169, 2006.

CAMERINO, M. *et al.* Evaluation of prognostic impact of pre-treatment neutrophil to lymphocyte and lymphocyte to monocyte ratios in dogs with oral malignant melanoma treated with surgery and adjuvant CSPG4-antigen electrovaccination: an explorative study. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 19, n. 2, 353-361, 2021.

CASSIDY, M. R. *et al.* Neutrophil to Lymphocyte Ratio is Associated With Outcome During Ipilimumab Treatment. **EBioMedicine**, v. 18, 56-61, 2017.

CASTRO, B. G. A. **Sepsis-3: Uma análise aplicada à medicina veterinária**. 2017. 40p. Trabalho de conclusão de curso – Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

CHAUDHRY, H. *et al.* Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. **In vivo**, v. 27, n. 6, 669-684, 2013.

CHEN, Y. *et al.* Role of platelet biomarkers in inflammatory response. **Biomarker Research**, v. 8, n. 28, 2020.

CLAUSHUIS, T. A. M. *et al.* Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response in critically ill sepsis patients. **Blood**, v. 127, n. 24, 3062-3072, 2016.

COGGAN, J. A. *et al.* Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 477-483, 2008.

CONWAY, E. A. *et al.* Retrospective investigation of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in dogs with pneumonia: 49 cases (2011–2016). **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 31, n. 4, 490-497, 2021.

DE BOSSCHERE, H. *et al.* Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected? **Theriogenology**, v. 55, n. 7, p. 1509-1519, 2001.

DE JAGER, C. P. C. *et al.* The Neutrophil-Lymphocyte Count Ratio in Patients with Community-Acquired Pneumonia. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

DE LAFORCADE, A. M. *et al.* Hemostatic Changes in Dogs with Naturally Occurring Sepsis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 5, 674-679, 2003.

DEWITTE, A. *et al.* Blood platelets and sepsis pathophysiology: A new therapeutic prospect in critical ill patients? **Annals of Intensive Care**, v. 7, n. 115, 1-18, 2017.

DJORDJEVIC, D. *et al.* Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio, Monocyte-to-Lymphocyte Ratio, Platelet-to-Lymphocyte Ratio, and Mean Platelet Volume-to-Platelet Count Ratio as Biomarkers in Critically Ill and Injured Patients: Which Ratio to Choose to Predict Outcome and Nature of Bacteremia? **Mediators of Inflammation**, v. 2018, 2018.

DRĂGOESCU, A. N. *et al.* Neutrophil to Lymphocyte Ratio (NLR)—A Useful Tool for the Prognosis of Sepsis in the ICU. **Biomedicines**, v. 10, n. 1, 2022.

DREWRY, A. *et al.* Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. **Shock**, v. 42, n. 5, 383-391, 2014.

DUGANI, S.; VEILLARD, J.; KISSOON, N. Reducing the global burden of sepsis. **Canadian Medical Association Journal**, v. 189, n. 1, e2-e3, 2017.

DURMUS, E. *et al.* Relações neutrófilo-linfócito e plaqueta-linfócito como preditores de insuficiência cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 105, n. 6, 606-613, 2015.

EGENVALL, A. *et al.* Breed Risk of Pyometra in Insured Dogs in Sweden. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.15, n. 6, p. 530-538, 2001.

EVANS, T. Diagnosis and management of sepsis. **Clinical Medicine**, v. 18, n. 2, 146, 2018.

FLEISHER, T. A.; BOSCO OLIVEIRA, J. Functional and molecular evaluation of lymphocytes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 2, 227-234, 2004.

FRANSSON, B. A. *et al.* C-reactive protein in the differentiation of pyometra from cystic endometrial hyperplasia/mucometra in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, n. 5, 391-399, 2004.

GAYRET, O. B.; EROL, M.; NACAROGLU, H. T. The relationship of neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio with gastrointestinal bleeding in Henoch-Schonlein Purpura. **Iranian Journal of Pediatrics**, v. 26, n. 5, 2016.

GEBHARDT, C. *et al.* Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis: Original Study. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 19, n. 5, p. 450-458, 2009.

GHIMIRE, S. *et al.* Current understanding and future implications of sepsis-induced thrombocytopenia. **European Journal of Haematology**, v. 106, n. 3, 301-305, 2021.

GIRARDOT, T. *et al.* Apoptosis-induced lymphopenia in sepsis and other severe injuries. **Apoptosis**, v.22, n. 2, 295-305, 2017.

GIUSTOZZI, M. *et al.* Coagulopathy and sepsis: Pathophysiology, clinical manifestations and treatment. **Blood Reviews**, v. 50, 2021.

GOTTS, J. E.; MATTHAY, M. A. For personal use only Sepsis: pathophysiology and clinical management. **BMJ**, 2016.

GROS, A.; OLLIVIER, V.; HO-TIN-NOÉ, B. Platelets in inflammation: Regulation of leukocyte activities and vascular repair. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 678, 1-8, 2015.

GUO, X. *et al.* Neutrophil:lymphocyte ratio is positively related to type 2 diabetes in a large-scale adult population: A Tianjin Chronic Low-Grade Systemic Inflammation and Health cohort study. **European Journal of Endocrinology**, v. 173, n. 2, 217-225, 2015.

HAGMAN, R. *et al.* Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F2 α metabolite analysis. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 198-206, 2006.

HAGMAN, R. *et al.* 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, n. suppl. 6, p. 323-325, 2012.

HAGMAN, R. Pyometra in Small Animals. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 48, n. 4, p. 639-661, 2018.

HAGMAN, R. Pyometra in Small Animals 2.0. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 52, n. 3, p. 631-657, 2022.

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, 393-397, 1997.

HODGSON, N.; LLEWELLYN, E. A.; SCHAEFFER, D. J. Utility and Prognostic Significance of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Dogs with Septic Peritonitis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 54, n. 6, 351-359, 2019.

HOLINSTAT, M. Normal platelet function. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 36, n. 2, 195-198, 2017.

HOTCHKISS, R. S. *et al.* Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. **Critical Care Medicine**, v. 27, n. 7, 1230-1251, 1999.

HOTCHKISS, R. S.; MONNERET, G.; PAYEN, D. Sepsis-induced immunosuppression: From cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, 862-874, 2013.

HUANG, Z. *et al.* Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in sepsis: A meta-analysis. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 38, n. 3, 641-647, 2020.

HUSZNO, J.; KOLOSZA, Z. Prognostic value of the neutrophil-lymphocyte, platelet-lymphocyte and monocyte-lymphocyte ratio in breast cancer patients. **Oncology Letters**, v. 18, n. 6, 6275-6283, 2019.

JITPEAN, S. *et al.* Breed Variations in the Incidence of Pyometra and Mammary Tumours in Swedish Dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. suppl. 6, p. 347-350, 2012.

JITPEAN, S. *et al.* Outcome of pyometra in female dogs and predictors of peritonitis and prolonged postoperative hospitalization in surgically treated cases. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 6, 2014.

JITPEAN, S. *et al.* Closed cervix is associated with more severe illness in dogs with pyometra. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 11, 2016.

KAHRAMANCA, Ş. *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictor of acute appendicitis. **Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery**, v. 20, n. 1, 19–22, 2014.

KENNEY, E. M. *et al.* Association between outcome and organ system dysfunction in dogs with sepsis: 114 cases (2003-2007). **Journal of the American Veterinary Association**, v. 236, n. 1, 2010.

KIM, S. *et al.* Association of neutrophil-to-lymphocyte ratio with mortality and cardiovascular disease in the jackson heart study and modification by the duffy antigen variant. **JAMA Cardiology**, v. 3, n. 6, p. 455–462, 1 jun. 2018.

KIM, Y. J. *et al.* Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio and its dynamic change during neoadjuvant chemotherapy as poor prognostic factors in advanced ovarian cancer. **Obstetrics and Gynecology Science**, v. 61, n. 2, p. 227–234, 1 mar. 2018.

KIM, J. Y. *et al.* Dynamic changes of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio predicts breast cancer prognosis. **BMC Cancer**, v. 20, n. 1, 2020.

KOH, C. H. *et al.* Utility of pre-treatment neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio as prognostic factors in breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 113, n. 1, 150-158, 2015.

KRIPLANI, A. *et al.* Neutrophil–lymphocyte ratio (NLR), platelet–lymphocyte ratio (PLR) and lymphocyte–monocyte ratio (LMR) in predicting systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and sepsis after percutaneous nephrolithotomy (PNL). **Urolithiasis**, v. 50, n. 3, 341-348, 2022.

KUMARI BAITHALU, R. *et al.* Canine Pyometra. **Veterinary World**, v.3, n. 7, p. 340-342, 2010.

LEVY, M. M. *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical Care Medicine**, v. 31, n. 4, 2003.

LEWIS, D. H. *et al.* The Immunopathology of Sepsis: Pathogen Recognition, Systemic Inflammation, the Compensatory Anti-Inflammatory Response, and Regulatory T Cells. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 3, 457-482, 2012.

LIU, L. *et al.* Is the platelet to lymphocyte ratio a promising biomarker to distinguish acute appendicitis? Evidence from a systematic review with meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 15, n. 5, 2020.

MACFARLANE, L. *et al.* Diagnostic value of neutrophil-lymphocyte and albumin-globulin ratios in canine soft tissue sarcoma. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 3, 135-141, 2016.

MAN, M. A. *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio, platelets-to-lymphocyte ratio, and eosinophils correlation with high-resolution computer tomography severity score in COVID-19 patients. **PLoS ONE**, v. 16, n. 6 June, 1 jun. 2021.

MESHAAL, M. S. *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) as independent predictors of outcome in infective endocarditis (IE). **Egyptian Heart Journal**, v. 71, n. 1, 2019.

MUTZ, M. *et al.* Prognostic value of baseline absolute lymphocyte concentration and neutrophil/lymphocyte ratio in dogs with newly diagnosed multi-centric lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 13, n. 4, 337-347, 2015.

NEUMANN, S. Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios in dogs and cats with acute pancreatitis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 50, n. 1, 45-51, 2021.

OLSEN SARAIVA CÂMARA, N. *et al.* Lymphocyte differentiation and effector functions. **Clinical and Developmental Immunology**, 2012.

ONO, S. *et al.* Mechanisms of sepsis-induced immunosuppression and immunological modification therapies for sepsis. **Annals of Gastroenterological Surgery**, v. 2, n. 5, 351-358, 2018.

OPAL, S. M.; WITTEBOLE, X. Biomarkers of Infection and Sepsis. **Critical Care Clinics**, v. 36, n. 1, 11-22, 2020.

PIERINI, A. *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio, nucleated red blood cells and erythrocyte abnormalities in canine systemic inflammatory response syndrome. **Research in Veterinary Science**, v. 126, p. 150-154, 2019.

PIERINI, A. *et al.* Are leukocyte and platelet abnormalities and complete blood count ratios potential prognostic markers in canine sepsis? **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, 1-7, 2020.

PIERRAKOS, C. *et al.* Biomarkers of sepsis: Time for a reappraisal. **Critical Care**, v. 24, n. 1, 287, 2020.

PILLAY, J. *et al.* A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 1, 327-336, 2012.

PLAVEC, T. *et al.* Haemostasis impairment in bitches with pyometra. **Acta Veterinaria**, v. 56, n. 5-6, 529-540, 2006.

PRASAD, V. D.; KUMAR, P. R.; SREENU, M. Pyometra in Bitches: A Review of Literature. **Research & Reviews: Journal of Veterinary Science and Technology**, v. 6, n. 2, p. 12-20, 2017.

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

REJEC, A. *et al.* Evaluation of complete blood count indices (NLR, PLR, MPV/PLT, and PLCRi) in healthy dogs, dogs with periodontitis, and dogs with oropharyngeal tumors as potential biomarkers of systemic inflammatory response. **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 34, n. 4, 231-240, 2017.

RESENDE, C. B. *et al.* Neutrophil activity in sepsis: A systematic review. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 53, n. 12, 2020.

RICHÉ, F. *et al.* Reversal of neutrophil-to-lymphocyte count ratio in early versus late death from septic shock. **Critical Care**, v. 19, n. 1, 2015.

SALOMÃO, R. *et al.* Sepsis: evolving concepts and challenges. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, 2019.

SANDQUIST, M.; WONG, H. R. Biomarkers of sepsis and their potential value in diagnosis, prognosis and treatment. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 10, n. 10, 1349-1356, 2014.

SANG, Y. *et al.* Interplay between platelets and coagulation. **Blood Reviews**, v. 46, 1-8, 2021.

SAYED, S. Z. *et al.* Admission platelet count and indices as predictors of outcome in children with severe Sepsis: A prospective hospital-based study. **BMC Pediatrics**, v. 20, n. 387, 1-9, 2020.

SCHÄFER-SOMI, S. Distúrbios uterinos comuns em cadelas: desafios no diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, 2015.

SCHRIJVER, I. T.; THÉROUDE, C.; ROGER, T. Myeloid derived suppressor cells sepsis. **Frontiers in Immunology**, 2019.

SCOTT, M. A., & STOCKHAM, S. L. Fundamentals of veterinary clinical pathology. **John Wiley & Sons**, 2013.

SENOUSY, S. R. *et al.* Cytokines in Sepsis: Friend or Enemy. **Journal of Advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, 29-39, 2022.

SENG, J. J. B. *et al.* Role of neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), platelet to lymphocyte ratio (PLR) and mean platelet volume (MPV) in assessing disease control in Asian patients with axial spondyloarthritis. **Biomarkers**, v. 23, n. 4, 335-338, 2018.

ŞEREFLİCAN, M. *et al.* Evaluation of mean platelet volume and neutrophil to lymphocyte ratio as a diagnostic indicator in patients with recurrent aphthous stomatitis. **ENT Updates**, v. 6, n. 2, 82-86, 2016.

SHARP, C. R. Systemic Inflammatory Response Syndrome, Sepsis, and Multiple Organ Dysfunction Syndrome. *In*: DROBATZ, K. J. *et al.* **Textbook of Small Animal Emergency Medicine**. John Wiley & Sons, 2019. p. 1030-1037.

SHEN, Y.; HUANG, X.; ZHANG, W. Platelet-to-lymphocyte ratio as a prognostic predictor of mortality for sepsis: Interaction effect with disease severity - A retrospective study. **BMJ Open**, v. 9, n. 1, 2019.

SHENG, I. Y. *et al.* Blood Myeloid-Derived Suppressor Cells Correlate with Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Overall Survival in Metastatic Urothelial Carcinoma. **Targeted Oncology**, v. 15, n. 2, p. 211–220, 1 abr. 2020.

- SHRESTHA, M. & KUMAR, A. 2018. Systemic inflammatory response syndrome: The current status. **Journal of Universal College of Medical Sciences**, v. 6, n. 1, 56-61.
- SINGER, M. *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). **Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, 801-810, 2016.
- SMITH, J. R.; SMITH, K. F.; BRAINARD, B. M. Platelet parameters from an automated hematology analyzer in dogs with inflammatory clinical diseases. **Veterinary Journal**, v. 201, n. 3, 406-411, 2014.
- SÔNEGO, F. *et al.* Paradoxical roles of the neutrophil in sepsis: Protective and deleterious. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 2016.
- SONMEZ, O.; SONMEZ, M. Role of platelets in immune system and inflammation. **Porto Biomedical Journal**, v. 2, n. 6, 311-314, 2017.
- TAMAYO, E. *et al.* Evolution of neutrophil apoptosis in septic shock survivors and nonsurvivors. **Journal of Critical Care**, v. 27, n. 4, p. 415.e1-415.e11, 2012.
- TAŠKLN, A.; CAN, E.; HAMILÇLKAN, Ş. Suspected or Proven Early-Onset Sepsis and NLR, PLR, and MPV Parameters in Neonates with Born through MSAF. **American Journal of Perinatology**, v. 39, n. 6, 609-615, 2022.
- TEMPLETON, A. J. *et al.* Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: A systematic review and meta-analysis. **Journal of the National Cancer Institute**, 2014.
- THOMAS, M. R.; STOREY, R. F. The role of platelets in inflammation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 114, n. 3, 449-458, 2015.
- TROIA, R.; GIUNTI, M.; GOGGS, R. Plasma procalcitonin concentrations predict organ dysfunction and outcome in dogs with sepsis. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, 1-9, 2018.
- TSUJIMOTO, H. *et al.* Role of toll-like receptors in the development of sepsis. **Shock**, v. 29, n. 3, 315-321, 2008.
- UÇMAK, Z. G.; KURBAN, İ.; UÇMAK, M. Assessment of hematological parameters and uterine hemodynamic indices in bitches with pyometra. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 49, 2021.
- VAN TON, A. M. P. *et al.* Precision immunotherapy for sepsis. **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., v. 9, 2018.
- VARDON-BOUNES, F. *et al.* Platelets are critical key players in sepsis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, 1-13, 2019.
- VINCENT J. L., MORENO R., TAKALA J., WILLATTS S., DE MENDONÇA A., BRUINING H., REINHART C. K., SUTER P. M., THIJLS L. G. The SOFA (Sepsis-related

Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. **Intensive Care Medicine**, v. 22, p. 707-710, 1996.

VOLPATO, R. **Avaliação clínica e imunoistoquímica do útero e cérvix de cadelas com o diagnóstico de piometra**. 2011. 113f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

WALTERS, A. M. *et al.* Comparison of clinical findings between dogs with suspected anaphylaxis and dogs with confirmed sepsis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 251, n. 6, 681-688, 2017.

WANG, L., ZHAO, H., & WANG, D. Inflammatory cytokine expression in patients with sepsis at an intensive care unit. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 16, n. 3, 2126–2131, 2018.

WANG, X. *et al.* Ratios of Neutrophil-to-Lymphocyte and Platelet-to-Lymphocyte Predict All-Cause Mortality in Inpatients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Retrospective Cohort Study in A Single Medical Center. **Epidemiology and Infection**, 2020.

WIERSINGA, W. J. *et al.* Host innate immune responses to sepsis. **In Virulence**, v. 5, n.1, 36-44, 2014.

ZENG, Z. *et al.* Prediction of neutrophil-to-lymphocyte ratio in the diagnosis and progression of autoimmune encephalitis. **Neuroscience Letters**, v. 694, p. 129-135, 2019.

ZHANG, Y. *et al.* Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in gastric cancer. **Medicine (United States)**, v. 97, n. 12, 2018.

ZHANG, J. *et al.* High Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Platelet-to-Lymphocyte Ratio Are Associated with Poor Survival in Patients with Hemodialysis. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.

ZHU, Y. *et al.* Platelet-lymphocyte ratio acts as an indicator of poor prognosis in patients with breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, 1023-1030, 2017.

CAPÍTULO II – UTILIDADE DA RELAÇÃO NEUTRÓFILO-LINFÓCITO E DA RELAÇÃO PLAQUETA-LINFÓCITO COMO BIOMARCADORES DA SEPSE EM CADELAS COM PIOMETRA

José Eduardo Silveira Coutinho; Anna Julia Rodrigues Peixoto; Virgínia Conceição Tavares Lima; Joshua Dylan Moise; Maria Eduarda dos Santos Lopes Fernandes; Cristiane Divan Baldani; Cássia Maria Molinaro Coelho

RESUMO

A sepsé é uma síndrome que assume grande importância em medicina veterinária e cujo diagnóstico representa grande desafio, devido a falta de marcadores específicos para tal. Neste contexto, a Relação Neutrófilo-linfócito (RNL) e a Relação Plaqueta-linfócito (RPL) têm sido propostas como ferramentas acessíveis e úteis ao diagnóstico e determinação prognóstica da sepsé em humanos, sendo ainda incerta sua utilidade na espécie canina. O objetivo deste estudo foi avaliar retrospectivamente se, a partir do diagnóstico de piometra, existe diferença dos valores de RNL e de RPL entre cadelas com e sem sepsé e se estas relações apresentam utilidade diagnóstica e de predição do óbito pela síndrome. Foram revisados os prontuários do Hospital Veterinário da UFRRJ entre os períodos de agosto de 2017 a dezembro de 2019, sendo incluídas cadelas saudáveis (grupo C, n=95) e com piometra (grupo P, n=128). As cadelas com piometra foram sublocadas nos grupos sem sepsé (PO, n=26), com sepsé (PS, n=102), sobreviventes de sepsé (SS, n=90) e não sobreviventes (SN, n=12). Variáveis epidemiológicas, de hemograma, os valores de RNL e de RPL e o número de disfunções orgânicas foram comparados entre os grupos (PO vs PS; SS vs SN), e foram realizadas análises de curva ROC para a determinação dos pontos de corte das variáveis para os desfechos sepsé e óbito. Análises de regressão logística foram realizadas para a avaliação da associação dos pontos de corte aos diferentes desfechos. Os valores de RNL não variaram entre os subgrupos PO e PS, e SS e SN, e os valores de RPL foram mais baixos em cadelas com sepsé. Não foi demonstrada boa acurácia da RNL e da RPL para o diagnóstico de sepsé e predição do desfecho de óbito pela síndrome em cadelas com piometra. O número de disfunções orgânicas obteve boa acurácia e elevada associação ao desfecho de óbito. Concluiu-se que a RNL e a RPL não apresentam utilidade para o diagnóstico e prognóstico da sepsé em cadelas com piometra.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Leucócitos, inflamação sistêmica, disfunção orgânica.

ABSTRACT.- [Utility of the neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios as biomarkers of sepsis in bitches with pyometra.] Sepsis comprises a syndrome of great importance in veterinary medicine and whose diagnosis represents a great challenge, due to the lack of specific markers for it. In this context, the Neutrophil-to-lymphocyte Ratio (NLR) and the Platelet-to-lymphocyte Ratio (PLR) have been proposed as accessible and useful tools for the diagnosis and prognostic determination of sepsis in humans. Its usefulness for this purpose in the canine species, however, remains uncertain. The aim of this study was to retrospectively evaluate whether there is a difference in the values of NLR and PLR between bitches with and without sepsis and whether these relationships are useful for diagnosis and prediction of death from the syndrome in patients with pyometra. The medical records of the UFRRJ Veterinary Hospital were reviewed between August 2017 and December 2019, including healthy bitches (group C, n=95) and pyometra (group P, n=128). Bitches with pyometra were suballocated into ¹groups without sepsis (PO, n=26), with sepsis (PS, n=102), sepsis survivors (SS, n=90) and non-survivors (SN, n=12). Epidemiological and blood count variables, NLR and PLR values and the number of organ dysfunctions were compared between groups (PO vs PS; SS vs SN), and ROC curve analyzes were performed to determine the cutoff points of the variables for sepsis and death outcomes. Logistic regression analyzes were performed to assess the association of cutoff points with different outcomes. The NLR values did not vary between the

PO and PS, and SS and SN subgroups. The sepsis group showed lower values of PLR. There was no good accuracy of the NLR and PLR for the diagnosis and prediction of death from sepsis in bitches with pyometra. The number of organ dysfunctions showed good accuracy and high association with the outcome of death. It was concluded that NLR and PLR are not useful tools for the diagnosis and prognosis determination of sepsis in bitches with pyometra.

INDEX TERMS: Leukocytes, systemic inflammation, organ dysfunction.

INTRODUÇÃO

A sepse compreende uma síndrome grave e que possui alta taxa de incidência e mortalidade em humanos (Gotts & Matthay 2016, Dugani et al. 2017) e em cães (Kenney et al. 2010) e cujo diagnóstico representa importante desafio em medicina veterinária, não havendo até então marcadores específicos. Durante décadas a sepse foi definida como a ocorrência da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) associada a infecção suspeita ou confirmada (Bone et al. 1992, Levy et al. 2003). Os critérios diagnósticos da SRIS incluem a presença de febre, taquicardia, taquipneia e leucocitose ou leucopenia (Hauptman 1997), os quais apresentam parâmetros de fácil mensuração e baixo custo de execução. Contudo, com a evolução do conhecimento sobre a fisiopatologia da sepse, compreendeu-se que esta representa maior complexidade e que envolve a ocorrência de mecanismos que vão além de inflamação exacerbada, o que tornou os critérios de SRIS inespecíficos para o seu diagnóstico (Gyawali et al. 2019). Sendo assim, o último consenso sobre a sepse passou a defini-la como uma síndrome que envolve disfunção orgânica como consequência de uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção (Singer et al. 2016). Foi proposta, então, a utilização de um escore composto por marcadores clínicos e laboratoriais de disfunção orgânica para o seu diagnóstico, denominado *Sepsis-related Organ Failure System* (SOFA) (Vincent et al. 1994, Singer et al. 2016). Este escore, no entanto, apresenta limitações relacionadas à acessibilidade e tempo necessário para obtenção dos resultados dos marcadores nele utilizados (Singer et al. 2016), além de não possuir validação para uso na espécie canina.

As alterações imunológicas representam a base do processo fisiopatológico da sepse (Font et al. 2020). A ativação prolongada do sistema imune inato leva a inflamação contínua, risco de disfunção orgânica e supressão do sistema imune adaptativo (Pillay et al. 2012, Drewry et al. 2014, Hodgson et al. 2019, Schrijver et al. 2019) e, neste contexto, os neutrófilos, linfócitos e plaquetas desempenham importante papel (Inoue et al. 2013, Sônego et al. 2016, Shen et al. 2019). O hemograma representa uma ferramenta acessível, de rápida execução e que permite a mensuração destes tipos celulares e do cálculo de relações entre eles (Hodgson et al. 2019, Neumann 2021, Conway et al. 2021). A Relação Neutrófilo-linfócito (RNL) e a Relação Plaqueta-linfócito têm sido descritas como biomarcadores que permitem a avaliação do equilíbrio entre mecanismos inflamatórios e de imunossupressão (Liu et al. 2020, Song et al. 2021) e que possuem utilidade no diagnóstico e determinação prognóstica em pacientes humanos com afecções inflamatórias (Kahramanca et al. 2014, Şerefican et al. 2016, Abaza et al. 2019, Pierini et al. 2019, Liu et al. 2020), cardiovasculares (Durmus et al. 2015, Li *et al.*, 2017, Kim et al. 2018, Afşin et al. 2019), neoplásicas (Bakacak et al. 2016, Cassidy et al. 2017, Zhang et al. 2018, Huszno & Kolosza 2019) e sepse (Shen et al. 2019, Huang et al. 2020). Em cães, alguns estudos demonstraram potencial da RNL e da RPL para uso clínico (MacFarlane et al. 2016, Neumann 2019, Pierini et al. 2019, Pierini et al. 2020, Becher et al. 2021), sendo, no entanto, ainda incerta sua utilidade na sepse canina devido à escassez de estudos.

Considerando-se que a RNL e a RPL representam marcadores de inflamação e estado imune facilmente mensuráveis, reprodutíveis e baratos, hipotetiza-se que estas relações possam ser ferramentas úteis ao diagnóstico e prognóstico da sepse em cadelas com piometra. Desta forma, os objetivos deste estudo foram avaliar se, a partir do diagnóstico de piometra, existe diferença dos valores de RNL e de RPL entre cadelas com sepse e sem sepse e se estas relações podem ser úteis como preditores da sepse e prognóstico de mortalidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo caso-controle realizado com base na revisão dos prontuários médicos de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (HV-UFRRJ), no período de agosto de 2017 a dezembro de 2019. Foram incluídas cadelas com diagnóstico clínico e ultrassonográfico de piometra tratadas cirurgicamente e cadelas admitidas para castração eletiva consideradas saudáveis com base em exame clínico e hemograma. Foram excluídas cadelas cujos prontuários apresentavam preenchimento incompleto e cadelas portadoras de comorbidades sistêmicas.

As cadelas portadoras de piometra foram alocadas no "grupo piometra" (P), e as saudáveis no "grupo controle" (C). O grupo P foi subdividido nos subgrupos "piometra com sepse" (PS) e "piometra sem sepse" (PO), e nos subgrupos "sepse sobreviventes" (SS) e "sepse não-sobreviventes" (SN). O diagnóstico de sepse foi determinado quando da presença de ao menos uma das seguintes disfunções orgânicas: renal, cardiovascular, hepática, hemostática, e do sistema nervoso central, com base em adaptação do consenso *Sepsis-3* (Singer et al. 2016). Os critérios utilizados para detecção das referidas disfunções orgânicas estão descritos no quadro 1. A gravidade da sepse foi determinada de acordo com a quantidade de disfunções orgânicas (1 a 4). A caracterização de sobrevivência ou óbito foi realizada com base em acompanhamento clínico das cadelas com piometra, realizado por um período de 14 dias a partir do momento da admissão. Foram consideradas sobreviventes as cadelas que sobreviveram durante todo o período de acompanhamento.

Quadro 1. Critérios para identificação de disfunção de órgãos em cadelas portadoras de piometra admitidas no Hospital Veterinário da UFRRJ, Seropédica, Brasil. Período de Agosto de 2017 a dezembro de 2019.

Disfunção orgânica	Critério
Renal	<i>Creatinina sérica > 1,7 mg/dL</i>
Cardiovascular	<i>Pressão arterial sistólica < 90 mmHg</i>
Hepática	<i>Bilirrubina total sérica > 0,5 mg/dL</i>
Hemostática	<i>Plaquetometria < 200.000/ μL</i>
Do Sistema Nervoso Central	<i>Escala de Glasgow Modificada para cães* < 13 pontos</i>

* Andrade et al., 2010.

Para todas as cadelas foram revisadas as seguintes variáveis: porte racial (de acordo com os critérios propostos pela Confederação Brasileira de Cinofilia- CBKC, 2019), idade, leucócitos totais, neutrófilos segmentados, neutrófilos bastonetes, linfócitos e plaquetas. Os valores de Relação Neutrófilo-linfócito (RNL) e de Relação Plaqueta-linfócito (RPL) foram calculados para todos os animais por meio da divisão das contagens de neutrófilos totais (neutrófilos segmentados + neutrófilos bastonetes) pelas contagens de linfócitos totais e das contagens de plaquetas totais pelas contagens de linfócitos totais, respectivamente. As variáveis utilizadas para o diagnóstico de sepse (creatinina sérica, pressão arterial sistólica, bilirrubina total sérica, plaquetometria e escala de coma de Glasgow modificada para cães) foram revisadas apenas para as cadelas do grupo P. A apresentação clínica da piometra foi classificada de acordo com a presença ou ausência de secreção vaginal no momento do exame clínico. A presença de secreção vaginal caracterizou a apresentação como de "cérvix aberta", enquanto a ausência de secreção vaginal caracterizou a apresentação como de "cérvix fechada".

Todas as análises estatísticas foram realizadas com a utilização do software *IBM Statistical Package for Social Science*, 20.0 (SPSS, Chicago, Illinois, EUA). Os resultados para as variáveis categóricas foram descritos como frequência e porcentagem e para as variáveis numéricas como mediana e intervalo. A normalidade da distribuição das variáveis foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. As análises estatísticas subsequentes foram realizadas da seguinte maneira: grupo P vs C; subgrupo PS vs PO; subgrupo SS vs SN. O teste de Mann-Whitney foi realizado para comparação dos valores de idade, leucometria total, neutrófilos segmentados, neutrófilos bastonetes, linfócitos, plaquetas e relações (RNL e RPL) entre os referidos grupos e subgrupos. A apresentação clínica da

piometra (“cérvix aberta” ou “cérvix fechada”) foi comparada entre os subgrupos de piometra. Para a determinação do desempenho diagnóstico e de determinação prognóstica da RNL, da RPL e do número de disfunções orgânicas foi realizada a análise de Curva ROC. Os valores de referência de área abaixo da curva (AUC) utilizados nesta análise foram: $>0,5$ e $<0,7$ (ruins); $\geq 0,7$ e $<0,8$ (aceitáveis); $\geq 0,8$ e $<0,9$ (excelentes) e $\geq 0,9$ (excepcionais) (Hosmer et al. 2013). O Índice de Youden foi usado para identificar o ponto de corte entre sensibilidade e especificidade das análises de Curva ROC (Youden 1950). A análise de regressão logística binária foi usada para estimar os valores de *odds ratio* (OR) a partir dos valores de corte estabelecidos para a variável teste em cada desfecho (sepse ou óbito). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 223 prontuários, sendo 95 prontuários de cadelas saudáveis (C) e 128 prontuários de cadelas diagnosticadas com piometra (P). A mediana de idade das cadelas com piometra foi superior à das cadelas saudáveis (8[1-16] vs 2[0,5-10] anos). A distribuição da frequência de portes raciais nas cadelas saudáveis foi de 17% de porte pequeno (16/95), 5% de porte médio (5/95), 11% de grande porte (10/95) e 67% dos cães sem raça definida na qual não foi possível determinar o porte (64/95). O grupo de cadelas com piometra (P) teve frequência de distribuição de portes raciais de 19% de porte pequeno (25/128), 20% de porte médio (26/128), 14% de grande porte (18/128) e 46% sem raça definida (59/128). Entre as cadelas com piometra, 102 foram classificadas com sepse (subgrupo PS) e 26 sem sepse (subgrupo PO); 116 foram classificadas como sobreviventes, entre elas 90 cadelas com sepse (grupo SS). Apenas cadelas com sepse vieram a óbito ($n=12$) em até 14 dias da admissão (subgrupo SN). Desta forma, a incidência de sepse foi de 79% e a mortalidade geral foi de 9%. Não houve diferença na incidência da apresentação clínica da piometra (cérvix aberta ou fechada) entre os subgrupos de piometra ($p \geq 0,05$). Os resultados de idade, apresentação clínica da piometra, variáveis laboratoriais e número de disfunções orgânicas estão descritos na tabela 1.

Em comparação a cadelas saudáveis, cadelas com piometra (P) apresentaram aumento significativo de leucócitos totais (26,8 [1,2 – 146,0] vs 11,0 [5,5-18,1] $\times 10^3$), neutrófilos (21,1 [0,3-84,9] vs 7,4 [3,1-12,0] $\times 10^3$), bastonetes (0,4 [0,0-40,9] vs 0,0 [0,0-0,0]%) e RNL (8,6 [0,0 – 47,0] vs 3,4 [1,0 – 10,1]), além de diminuição da contagem de plaquetas (172 [20-848] vs 271 [156-478] $\times 10^3$) e de RPL (72 [0 – 493] vs 132 [42-364]). Por sua vez, cadelas com sepse (PS) apresentaram menores valores de linfócitos (2,2 [0,0-16,9] vs 3,0 [1,1-9,1] $\times 10^3$), plaquetas (148 [20-848] vs 298 [203-570] $\times 10^3$) e RPL (66 [0 – 493] vs 80 [29 – 373]) que cadelas sem sepse (PO); e animais que vieram a óbito (SN) apresentaram maiores valores de leucócitos totais (40,7 [7,9 – 146,2] vs 26,0 [1,2-102,1] $\times 10^3$), linfócitos (4,1 [0,9-16,9] vs 2,1 [0,0-15,8] $\times 10^3$), plaquetas (162 [32-276] vs 144 [20-848] $\times 10^3$) e número de disfunções orgânicas (4 [1-5] vs 1 [1-5]) que cadelas do grupo sepse sobreviventes (SS). Os valores de RNL e RPL não variaram significativamente entre cadelas sobreviventes e não-sobreviventes.

A RNL não apresentou um bom desempenho para diagnóstico de sepse (AUC 0,59; IC 95% 0,456-0,721; $p=0,196$), bem como para predição de óbito por sepse (AUC 0,46; IC 95% 0,319-0,610; $p=0,692$). O mesmo foi demonstrado com relação a RPL para os referidos desfechos (AUC 0,68; IC 95% 0,574-0,974; $p < 0,001$ e AUC 0,343; IC 95% 0,154-0,532; $p=0,082$, respectivamente) (Fig. 1-2).

O número de disfunções orgânicas demonstrou bom valor preditivo de óbito por sepse em cadelas com piometra (AUC 0,83; IC 95% 0,698-0,969; $p < 0,001$), com o uso de valores de corte ≥ 2 disfunções correspondendo a 75% de sensibilidade e 82% de especificidade e OR 11,2 (IC 95% 1,393 - 90,852; $p=0,023$) para tal.

Tabela 1. Dados estatísticos descritivos de cadelas saudáveis (C, n=95) e cadelas com piometra (P, n=128) atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Seropédica, Brasil), período de agosto de 2017 a dezembro de 2019. O grupo P foi subdividido nos subgrupos piometra com e sem sepse ([PS, n=102] e [PO, n=26], respectivamente), sobreviventes e (SS, n=90) e não sobreviventes (SN, n=12). A comparação entre grupos e subgrupos foi realizada da seguinte maneira: P vs C; PO vs PS; SS vs SN.

	Cadelas SAUDÁVEIS (C) n= 95	Cadelas com PIOMETRA (P) n=128	Piometra SEM SEPSE (PO) n=26	Piometra COM SEPSE (PS) n=102	Sepse SOBREVIVENTES (SS) n=90	Sepse NÃO SOBREVIVENTES (SN) n=12
Idade (anos)	2 [0,5-10]	8 [1-16]*	7 [1-16]	8 [1-16]	8 [1-16]	10 [3-14]
Cérvix aberta	-	87 (68%)	15 (58%)	72 (70%)	65 (72%)	7 (58%)
Cérvix fechada	-	41 (32%)	11 (42%)	30 (30%)	25 (28%)	5 (42%)
Leucometria (x10 ³)	11,0 [5,5-18,1]	26,8 [1,2 – 146,0]*	25,8 [7,0 – 54,4]	26,8 [1,2 – 146,2]	26,0 [1,2-102,1] ^(b)	40,7 [7,9 – 146,2]
Neutrófilos (x10 ³)	7,4 [3,1-12,0]	21,1 [0,3-84,9]*	20,1 [2,1-55,5]	21,1 [0,3-84,9]	20,5 [0,3-84,9]	32,6 [5,7-84,8]
Bastonetes (%)	0,0 [0,0-0,0]	0,4 [0,0-40,9]*	0,1 [0-14,1]	0,5 [0,0-40,9]	0,5 [0,0-9,2]	1,3 [0-40,9]
Linfócitos (x10 ³)	2,2 [0,8-4,6]	2,4 [0,6-16,9]	3,0 [1,1-9,1]	2,2 [0,0-16,9] ^(a)	2,1 [0,0-15,8] ^(b)	4,1 [0,9-16,9]
Plaquetas (x10 ³)	271 [156-478]	172 [20-848]*	298 [203-570]	148 [20-848] ^(a)	144 [20-848] ^(b)	162 [32-276]
RNL	3,4 [1,0 – 10,1]	8,6 [0,0 – 47,0]*	7,5 [0,5 – 46,5]	8,7 [0,0 – 47,0]	9,0 [0,0 – 47,0]	7,2 [3,2 – 21,2]
RPL	132 [42-364]	72 [0 – 493]*	80 [29 – 373]	66 [0 – 493] ^(a)	69 [0 – 493]	25 [11 – 180]
Número de disfunções orgânicas	-	1 [0-5]	0 [0-0]	2 [1-5] ^(a)	1 [1-5] ^(b)	4 [1-5]

* significância estatística em relação ao grupo C; ^(a) significância estatística entre os subgrupos PO e PS; ^(b) significância estatística entre os subgrupos SS e SN; p<0,05

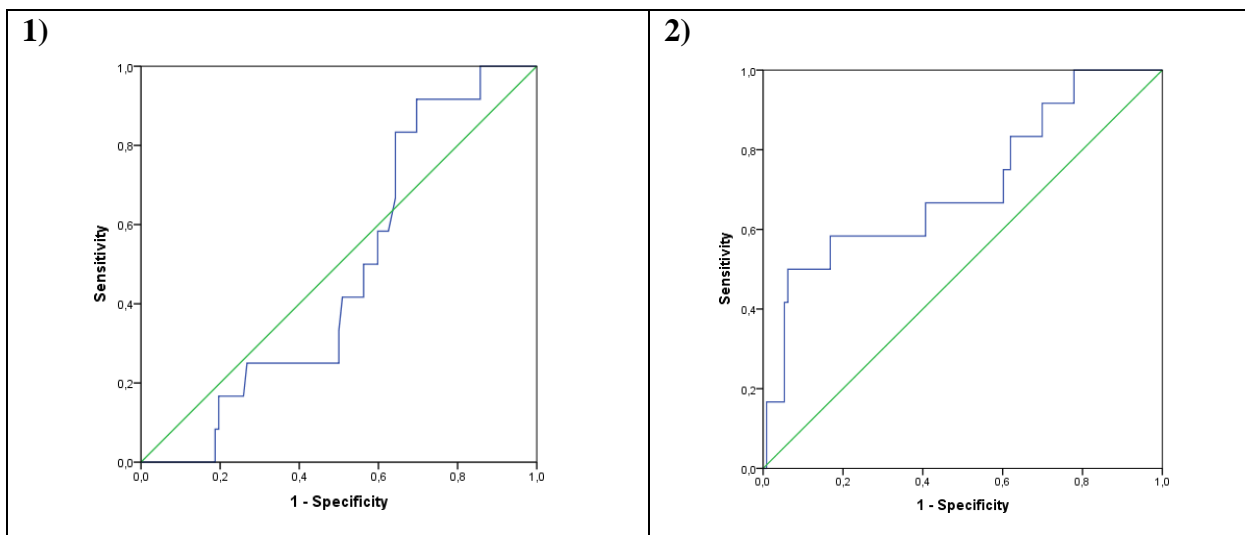


Figura 1-2. Curva ROC da Relação Neutrófilo-Linfócito (RNL) e Relação Plaqueta-Linfócito (RPL) em cadelas portadoras de piometra e sepse. Em (1), RNL para predição de óbito por sepse; (2). RPL para predição de óbito por sepse. Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Seropédica, Brasil), período de agosto de 2017 a dezembro de 2019.

DISCUSSÃO

A idade de 8 [1-16] anos demonstrada na população de cadelas com piometra do presente estudo se assemelha ao demonstrado em outros estudos e se encontra bem estabelecido na literatura científica (Hagman et al. 2011, Jitpean et al. 2012, Ahmed Shah et al. 2017, Anjos et al. 2021). A maior incidência de piometra em cadelas mais velhas se justifica pelo papel que a estimulação crônica desempenhada pela progesterona exerce sobre o endométrio ao longo dos anos (Dow 1959, Smith 2006).

Apesar da incidência de sepse em cães ser desconhecida (Camargo Junior et al. 2021), no presente estudo foi observado uma frequência alta na população estudada (79%). Outros estudos avaliaram a incidência de sepse em cadelas portadoras de piometra, sendo demonstrados valores próximos aos do presente estudo (74%) (Jitpean et al. 2014), e também valores discrepantes (59%) (Jitpean et al. 2017). É importante ressaltar, no entanto, que os referidos estudos utilizaram os critérios diagnósticos antigos para a sepse (Hauptman et al. 1997, Singer et al. 2016).

A mortalidade por piometra de 9% se encontra dentro do descrito em outros estudos semelhantes a esse (Egenvall et al. 2001, Jitpean et al. 2014, Prasad et al. 2017). Sobre a apresentação clínica desta afecção, estudos tem implicado a ocorrência da cérvix fechada como possível determinante de maior gravidade, por esta impedir a eliminação de exsudato uterino (Jitpean et al. 2017, PRASAD et al. 2021, Santana & Santos 2021), o que diferiu dos resultados da presente pesquisa, bem como dos resultados demonstrados por outros autores (Volpato et. 2011, Uçmak et al. 2021). Acredita-se, portanto, que os níveis inflamatórios e de endotoxemia determinados pela afecção (Hagman et al. 2006), os quais são importantes componentes da fisiopatogenia da piometra (Hagman 2022), possivelmente não sofram influência do maior acúmulo de exsudato uterino determinado pela apresentação de cérvix fechada. Entretanto, é importante considerar que a ausência de descarga vulvar relacionada a apresentação de cérvix

fechada pode interferir sobre a percepção mais precoce da doença pelos proprietários, e, consequentemente, levar a procura por atendimento veterinário em estágios de maior gravidade clínica (Santana & Santos 2021), o que pode ser a causa dos resultados divergentes entre os estudos disponíveis sobre o tema na literatura científica.

Estudos anteriores têm sugerido uma possível utilidade da RNL e da RPL como biomarcadores da sepse canina (Hodgson et al. 2019, Pierini et al. 2020), o que contrasta com os resultados do presente estudo. Entretanto, em tais estudos foram utilizados os critérios diagnósticos de SRIS associados a suspeita de infecção para o diagnóstico da sepse, o que se encontra desatualizado (Hauptman et al. 1997, Singer et al. 2016). De fato, diversos outros estudos com cães corroboram a utilidade destas relações para afecções associadas a ocorrência de SRIS, como a pancreatite (Neumann 2021), as enteropatias (Benvenuti et al. 2020), os sarcomas de tecidos moles (MacFarlane et al. 2016), a periodontite e as neoplasias orofaríngeas (Rejec et al. 2017). A sepse, no entanto, é atualmente reconhecida como uma síndrome que envolve mecanismos mais complexos e que vão além da inflamação sistêmica, cursando, obrigatoriamente, com disfunção de órgãos (Singer et al. 2016), e cujas dinâmicas de neutrófilos, linfócitos e plaquetas não são bem compreendidas na espécie canina devido a sua falta de padronização diagnóstica.

Em seres humanos, atualmente, se reconhece na sepse a ocorrência de um estado imunossupressivo concomitante ao processo inflamatório sistêmico (Nakamori et al. 2021). Tal estado, o qual é marcado pela presença de linfopenia, também foi demonstrado nas cadelas sépticas do presente estudo, e tem sido atribuído a um aumento da taxa de apoptose dos linfócitos e à ocorrência de mecanismos compensatórios para contrabalancear a exacerbação do processo inflamatório sistêmico (Luan et al. 2015, Girardot et al. 2017).

A linfopenia da sepse é considerada um importante fator determinante de pior prognóstico devido à sua interferência sobre a debelação do agente infeccioso e ao maior risco de desenvolvimento de infecções nosocomiais (Inoue et al. 2013, Shubin et al. 2013, Drewry et al. 2014, Girardot et al. 2017). No presente estudo, no entanto, foi observada uma dinâmica paradoxal dos linfócitos no subgrupo óbito, o qual apresentou valores maiores em comparação ao subgrupo de cadelas sobreviventes. Tal dinâmica linfocitária em pacientes sépticos com pior prognóstico já foi demonstrada como possível causa de valores mais baixos de RNL em seres humanos, e pode ser atribuída ao envolvimento de mecanismos imunológicos distintos e que determinem maior gravidade (Riché et al. 2015), ou a fases mais avançadas da síndrome, uma vez que a depleção linfocitária pode ser mais acentuada em suas fases mais precoces (Le Dorze et al. 2015). Acredita-se, portanto, na ocorrência de dinâmicas semelhantes na sepse canina e na sua possível interferência sobre elevações da RNL em pacientes mais graves.

A interrelação entre a ocorrência de imunossupressão e de inflamação sistêmica na sepse (Hodgson et al. 2019) faz possível esperar que cadelas sépticas imunossuprimidas pudessem apresentar maiores contagens de marcadores inflamatórios do hemograma, como os neutrófilos (Brown et al. 2006; Resende et al. 2020) e as plaquetas (Shen et al. 2019; Neumann, 2021) em comparação às cadelas sem sepse, o que, no entanto, não ocorreu no presente estudo, e representa, em grande parte, a causa da falta de utilidade diagnóstica da RNL e da RPL para a sepse também demonstrada.

Acredita-se, portanto, que os mecanismos de redução da taxa de apoptose dos neutrófilos, os quais determinam as elevações de suas contagens na sepse em humanos (Shen et al. 2021), possam apresentar menor importância na sepse canina. O único estudo localizado que utilizou critérios semelhantes ao do presente demonstrou ser mais frequente a ocorrência de leucopenia do que leucocitose em cães com sepse. No entanto, no referido estudo foram utilizados cães com

gastroenterite viral, o que, sabidamente, resulta em tal comportamento leucocitário (Isola et al. 2013).

É importante considerar, também, a possibilidade de que a piometra, devido a intensa neutrofilia que costuma causar (Bartoskova et al. 2007, Hagman 2012; Shah et al. 2017) e que também foi observada no presente estudo, tenha resultado em menores variações das contagens de neutrófilos entre as cadelas com e sem sepse e entre as sobreviventes e o subgrupo óbito, impedindo a ocorrência de significância estatística. Por outro lado, também já foi demonstrado que a piometra em estágios mais avançados resulta menos frequentemente em leucocitose do que estágios mais precoces da afecção (Jitpean et al. 2014), o que ocorre devido a supressão da medula óssea induzida pela endotoxemia em combinação com a inflamação crônica (Kiehl et al. 1997, Ward et al. 2008). Sendo assim, a piometra pode também ter resultado em menores magnitudes de neutrofilia no subgrupo óbito do presente estudo e contribuído para a falta de elevações da RNL.

De modo semelhante, é possível que a piometra tenha resultado em valores de contagens plaquetárias mais baixos que o esperado nas cadelas do subgrupo com sepse devido a frequente indução de trombocitopenia que esta afecção causa (Plavec et al. 2006, Shah et al. 2017), e, consequentemente, interferido sobre o comportamento de redução dos valores de RPL observados neste grupo de animais, o que contrasta com o demonstrado em estudos desta relação com a sepse em humanos (Kriplani et al. 2022) e com a SRIS em cães (Pierini et al. 2020), os quais demonstram a ocorrência de elevação desta relação.

Os maiores valores de plaquetometria no subgrupo óbito em comparação ao subgrupo de sobreviventes do presente estudo sugerem a ocorrência de um estado inflamatório mais exacerbado quando da ocorrência de piores prognósticos na sepse canina, e corroboram as plaquetas como elementos marcadores da inflamação sistêmica (Jenne & Kubes 2015, Chen et al. 2020, Neumann 2021). É possível, portanto, que a progressão do estado inflamatório em cadelas sépticas possa compensar as reduções plaquetárias resultantes da piometra, resultando em elevação de suas contagens. Dessa forma, acredita-se que a utilização de afecções não causadoras de trombocitopenia *per se* como modelos de estudo da RPL no prognóstico da sepse em cães possa resultar em maiores elevações plaquetárias que a observada no presente estudo e, consequentemente, na possível utilidade desta relação na predição do óbito pela síndrome.

Os marcadores de disfunção orgânica, de modo semelhante ao demonstrado para seres humanos quando da sua aplicação nos escores SOFA (Reith et al. 2017), foram demonstrados importantes fatores preditivos e de associação ao óbito pela sepse canina quando utilizados para quantificação do número de disfunções orgânicas no presente trabalho. Sendo assim, a despeito de suas limitações em Medicina Veterinária, as quais se relacionam à menor aplicabilidade clínica, se recomenda sua utilização para a determinação prognóstica da sepse em cães até que sejam estabelecidos melhores marcadores para tal.

É importante ressaltar que, além das limitações relacionadas a afecção utilizada como modelo de estudo da sepse no presente estudo, a falta de consenso diagnóstico da síndrome em Medicina Veterinária representa outro importante fator limitante. Além disso, o caráter retrospectivo do presente estudo impediu a inclusão da disfunção respiratória como critério diagnóstico da sepse, a qual representa uma das seis disfunções orgânicas propostas para tal (Singer et al. 2016), o que pode ter resultado em menor sensibilidade diagnóstica.

CONCLUSÃO

A ocorrência de sepse em cadelas com piometra não determina variações significativas dos valores de RNL, e determina reduções dos valores de RPL. Ambas as relações não foram demonstradas ferramentas úteis ao diagnóstico e à determinação prognóstica da sepse em cadelas com esta afecção.

Agradecimentos.- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Declaração de conflito de interesse.- Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Abaza N. M., Abd El-Latif E. M., & Gheita T. A. 2019. Clinical significance of neutrophil/lymphocyte ratio in patients with granulomatosis with polyangiitis. *Reumatología Clínica (English Edition)*, 15(6), 363-367. <doi : 10.1016/j.reumae.2017.11.009>
- Afşin A., Asoğlu R., Kurtoğlu E., Kaya H. 2019. Neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor of left ventricular hypertrophy in patients with newly diagnosed hypertension. *J Hypertens Manag*, 5, 042. <doi : 10.23937/2474-3690/1510042>
- Andrade M. B., Cole E. F., Evêncio Neto J., Silva A. C. J., Aleixo G. A. S., Cunha A. L. T. 2010. Escala de coma de Glasgow pediátrica modificada para cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62(1), 47-53. <<https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000100007>>
- Anjos M. S., Bittencourt R. F., Biscarde C. E., de Andrade Silva M. A., dos Santos E. S., Junior L. D., da Silva Cavalcante A. K. 2021. Canine pyometra: interferences of age and type in blood count and serum biochemistry. *Revista Brasileira de Ciencia Veterinária*, 28(3), 167-173. <doi : 10.4322/rbcv.2021.031>
- Bakacak M., Serin S., Ercan Ö., Köstü B., Bostanci M. S., Bakacak Z., ... & Kiran G. 2016. Utility of preoperative neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios to distinguish malignant from benign ovarian masses. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, 17(1), 21. <doi: 10.5152/jtgga.2015.0152.>
- Bartoskova A., Vitasek R., Leva L., & Faldyna M. 2007. Hysterectomy leads to fast improvement of haematological and immunological parameters in bitches with pyometra. *Journal of Small Animal Practice*, 48(10), 564-568. <doi:10.1111/j.1748-5827.2007.00345.x>
- Benvenuti E., Pierini A., Gori E., Lucarelli C., Lubas G., & Marchetti V. 2020. Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in canine inflammatory bowel disease (IBD). *Veterinary Sciences*, 7(3), 141. <doi:10.3390/vetsci7030141>

Becher A., Suchodolski J. S., Steiner J. M., & Heilmann R. M. 2021. Blood neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) as a diagnostic marker in dogs with chronic enteropathy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 33(3), 516-527. <doi:10.1177/1040638721992057>

Bone R. C., Balk R. A., Cerra F. B., Dellinger R. P., Fein A. M., Knaus W. A., Schein R. M., Sibbald W. J. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, 101(6), 1644-1655. <doi : 10.1378/chest.101.6.1644>

Brown K. A., Brain S. D., Pearson J. D., Edgeworth J. D., Lewis S. M., & Treacher D. F. 2006. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *The Lancet*, 368(9530), 157-169. <doi:10.1016/s0140-6736(06)69005-3>

Camargo Junior V. E., Arias M. V. B., Perugini M. R. 2021. Clinical and microbiological characteristics of dogs in sepsis in an academic veterinary hospital in the north of Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 40, 903-913. <<https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6277>>

Cassidy M. R., Wolchok R. E., Zheng J., Panageas K. S., Wolchok J. D., Coit D., Ariyan C. 2017. Neutrophil to lymphocyte ratio is associated with outcome during ipilimumab treatment. *EBioMedicine*, 18, 56-61. <doi : 10.1016/j.ebiom.2017.03.029>

Chen Y., Zhong H., Zhao Y., Luo X., & Gao W. 2020. Role of platelet biomarkers in inflammatory response. *Biomarker Research*, 8(1), 1-7. <doi:10.1186/s40364-020-00207-2>

Conway E. A., Pizarro Del Valle C., Waugh E. M., French A., Ridyard A. E. 2021. Retrospective investigation of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in dogs with pneumonia: 49 cases (2011–2016). *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 31(4), 490-497. <doi : 10.1111/vec.13067>

Dow C. 1959. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 69, 237-IN18. <doi:10.1016/s0368-1742(59)80023-0>

Drewry A. M., Samra N., Skrupky L. P., Fuller B. M., Compton S. M., Hotchkiss R. S. 2014. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock* (Augusta, Ga.), 42(5), 383. <doi:10.1097/shk.0000000000000234>

Dugani S., Veillard J., & Kissoon N. 2017. Reducing the global burden of sepsis. *Cmaj*, 189(1), E2-E3. <doi : 10.1503/cmaj.160798>

Durmus E., Kivrak T., Gerin F., Sunbul M., Sari I., Erdogan O. 2015. Relações Neutrófilo-Linfócito e Plaqueta-Linfócito como preditores de insuficiência cardíaca. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 105, 606-613. <doi: <https://doi.org/10.5935/abc.20150126>>

Egenvall A., Hagman R., Bonnett B. N., Hedhammar A., Olson P., Lagerstedt A. S. 2001. Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. *Journal of veterinary internal medicine*, 15(6), 530-538. < doi: 10.1892/0891-6640(2001)015<0530:bropii>2.3.co;2.>

Font M. D., Thyagarajan B., Khanna A. K. 2020. Sepsis and Septic Shock—Basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making. *Medical Clinics*, 104(4), 573-585. <doi : 10.1016/j.mcna.2020.02.011>

Girardot T., Rimmelé T., Venet F., Monneret G. 2017. Apoptosis-induced lymphopenia in sepsis and other severe injuries. *Apoptosis*, 22(2), 295-305. <doi:10.1007/s10495-016-1325-3>

Gotts J. E. & Matthay M. A. 2016. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *Bmj*, 353. <10.1136/bmj.i1585>

Gyawali B., Ramakrishna K., & Dhamoon A. S. (2019). Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *SAGE open medicine*, 7, 2050312119835043 <doi : 10.1177/2050312119835043>

Hagman R., Lagerstedt A. S., Hedhammar Å., Egenvall A. 2011. A breed-matched case-control study of potential risk-factors for canine pyometra. *Theriogenology*, 75(7), 1251-1257. <doi:10.1016/j.theriogenology.2010.11.038>

Hagman R. 2012. Clinical and molecular characteristics of pyometra in female dogs. *Reproduction in domestic animals*, 47, 323-325. <DOI: 10.1111/rda.12031>

Hagman R. 2022. Pyometra in Small Animals 2.0. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 52(3), 631-657. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.01.004>

Hagman R., Kindahl H., Lagerstedt A. S. 2006. Pyometra in Bitches Induces Elevated Plasma Endotoxin and Prostaglandin F2 α Metabolite Levels. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 47(1), 1-14. < doi: 10.1186/1751-0147-47-55.>

Hauptman J. G., Walshaw R., Olivier N. B. 1997. Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Veterinary surgery*, 26(5), 393-397. <doi:10.1111/j.1532-950x.1997.tb01699.x>

Hodgson N., Llewellyn E. A., Schaeffer D. J. 2018. Utility and prognostic significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio in dogs with septic peritonitis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 54(6), 351-359. <doi:10.5326/jaaha-ms-6808>

Hosmer Jr D. W., Lemeshow S., Sturdivant R. X. 2013. *Applied logistic regression* (Vol. 398). John Wiley & Sons.

Huang Z., Fu Z., Huang W., Huang K. 2020. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in sepsis: a meta-analysis. *The American journal of emergency medicine*, 38(3), 641-647. <doi : 10.1016/j.ajem.2019.10.023>

Huszno J., Kolosza Z. 2019. Prognostic value of the neutrophil-lymphocyte, platelet-lymphocyte and monocyte-lymphocyte ratio in breast cancer patients. *Oncology Letters*, 18(6), 6275-6283. <doi : [10.3892/ol.2019.10966](https://doi.org/10.3892/ol.2019.10966)>

Inoue S., Suzuki-Utsunomiya K., Okada Y., Taira T., Iida Y., Miura N., Inokuchi S. 2013. Reduction of immunocompetent T cells followed by prolonged lymphopenia in severe sepsis in the elderly. *Critical care medicine*, 41(3), 810-819. <doi:10.1097/ccm.0b013e318274645f>

Isola J. G. M. P., Santana A. E., Moraes P. C., Xavier D. M., Rabelo R. C. 2014. Estudo da incidência de SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico, diagnosticados no atendimento de emergência em cães hospitalizados com gastroenterite. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, 12(2), 12-17. <doi: <https://doi.org/10.36440/recmvz.v12i2.23919>>

Jenne C. N., Kubes P. 2015. Platelets in inflammation and infection. *Platelets*, 26(4), 286-292.

Jitpean S., Hagman R., Ström Holst B., Höglund O. V., Pettersson A., Egenvall A. 2012. Breed variations in the incidence of pyometra and mammary tumours in Swedish dogs. *Reproduction in domestic animals*, 47, 347-350. <doi:10.1111/rda.12103>

Jitpean S., Ström-Holst B., Emanuelson U., Höglund O. V., Pettersson A., Alneryd-Bull C., Hagman R. 2014. Outcome of pyometra in female dogs and predictors of peritonitis and prolonged postoperative hospitalization in surgically treated cases. *BMC veterinary research*, 10(1), 1-12. <doi : 10.1186/1746-6148-10-6>

Jitpean S., Pettersson A., Höglund O. V., Ström-Holst B., Olsson U., Hagman R. 2014. Increased concentrations of Serum amyloid A in dogs with sepsis caused by pyometra. *BMC Veterinary Research*, 10 (273). <doi: <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0273-9>>

Jitpean S., Ambrosen A., Emanuelson U., Hagman R. 2016. Closed cervix is associated with more severe illness in dogs with pyometra. *BMC veterinary research*, 13(1), 1-7. <doi : 10.1186/s12917-016-0924-0>

Kahramanca Ş., Özgehan G., Şeker D., Gökce E. İ., Şeker, G., Tunç, G., Kargıcı, H. 2014. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictor of acute appendicitis. *Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 20(1), 19-22. <doi : 10.5505/tjtes.2014.20688>

Kenney E. M., Rozanski E. A., Rush J. E., deLaforcade-Buress A. M., Berg J. R., Silverstein D. C., Shaw S. P. 2010. Association between outcome and organ system dysfunction in dogs with sepsis: 114 cases (2003–2007). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(1), 83-87. <doi : 10.2460/javma.236.1.83>

Kiehl M. G., Ostermann H., Meyer J., Kienast J. 1997. Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME in leukocytopenic patients with severe septic shock. *Intensive care medicine*, 23(5), 561-566. <doi : 10.1007/s001340050373>

Kim S., Eliot M., Koestler D. C., Wu W. C., Kelsey K. T. 2018. Association of neutrophil-to-lymphocyte ratio with mortality and cardiovascular disease in the Jackson Heart Study and modification by the Duffy antigen variant. *JAMA cardiology*, 3(6), 455-462. <doi : 10.1001/jamacardio.2018.1042>

Kriplani A., Pandit S., Chawla A., de la Rosette J. J., Laguna P., Jayadeva Reddy S., Somani B. K. 2022. Neutrophil–lymphocyte ratio (NLR), platelet–lymphocyte ratio (PLR) and lymphocyte–monocyte ratio (LMR) in predicting systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and sepsis after percutaneous nephrolithotomy (PNL). *Urolithiasis*, 50(3), 341-348. < DOI: 10.1007/s00240-022-01319-0>

Le Dorze M., Tarazona V., Brumpt C., Moins-Teisserenc H., Lukaszewicz A. C., Payen D. 2015. Lymphocyte phenotype during severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Medicine Experimental*, 3(1), 1-2. <doi : 10.1186/2197-425x-3-s1-a622>

Levy M. M., Fink M. P., Marshall J. C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S. M., Vincent J., Ramsay G. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive care medicine*, 29(4), 530-538. <doi : 10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B.>

Li H., Lu X., Xiong R., Wang S. 2017. High neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts cardiovascular mortality in chronic hemodialysis patients. *Mediators of Inflammation*, 2017. <doi : doi:10.1155/2017/9327136>

Liu L., Shao Z., Yu H., Zhang W., Wang H., & Mei Z. 2020. Is the platelet to lymphocyte ratio a promising biomarker to distinguish acute appendicitis? Evidence from a systematic review with meta-analysis. *PloS one*, 15(5), e0233470. <doi : 10.1371/journal.pone.0233470>

Luan Y. Y., Yao Y. M., Xiao X. Z., Sheng Z. Y. 2015. Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 35(1), 17-22. <doi:10.1089/jir.2014.0069>

Macfarlane L., Morris J., Pratschke K., Mellor D., Scase T., Macfarlane M., McLauchlan G. 2016. Diagnostic value of neutrophil–lymphocyte and albumin–globulin ratios in canine soft tissue sarcoma. *Journal of Small Animal Practice*, 57(3), 135-141. <doi : 10.1111/jsap.12435>

Nakamori Y., Park E. J., Shimaoka M. 2021. Immune deregulation in sepsis and septic shock: reversing immune paralysis by targeting PD-1/PD-L1 pathway. *Frontiers in Immunology*, 11, 624279. <doi: 10.3389/fimmu.2020.624279>

Neumann S. 2021. Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios in dogs and cats with acute pancreatitis. *Veterinary Clinical Pathology*, 50(1), 45-51. <doi : 10.1111/vcp.12979>

Pierini A., Gori E., Lippi I., Ceccherini G., Lubas G., Marchetti V. 2019. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, nucleated red blood cells and erythrocyte abnormalities in canine systemic inflammatory response syndrome. *Research in veterinary science*, 126, 150-154. <doi : 10.1016/j.rvsc.2019.08.028>

Pierini A., Gori E., Lippi I., Lubas G., Marchetti V. 2020. Are leukocyte and platelet abnormalities and complete blood count ratios potential prognostic markers in canine sepsis? *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 578846. <doi: 10.3389/fvets.2020.578846>

Pillay J., Kamp V. M., Van Hoffen E., Visser T., Tak T., Lammers J. W., Ulfman L. H., Leenen L. P., Pickkers P., Koenderman L. 2012. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *The Journal of clinical investigation*, 122(1), 327-336. <doi : 10.1172/jci57990>

Plavec T., Celinšek B., Dolinar K., Pečar J., Nemec A., Butinar J. 2006. Haemostasis impairment in bitches with pyometra. *Acta veterinaria*, 56(5-6), 529-540. <doi : 10.2298/avb0606529p>

Prasad V. D., Kumar P. R., Sreenu M. 2017. Pyometra in bitches: A review of literature. *Research & Reviews: Journal of Veterinary Science and Technology*, 6(2), 12-20. <doi: <https://doi.org/10.37591/rjovst.v6i2.563>>

Raith E. P., Udy A. A., Bailey M., McGloughlin S., MacIsaac C., Bellomo R., Pilcher D. V. 2017. Prognostic accuracy of the SOFA score, SIRS criteria, and qSOFA score for in-hospital mortality among adults with suspected infection admitted to the intensive care unit. *Jama*, 317(3), 290-300. <doi:10.1001/jama.2016.20328>

Rejec A., Butinar J., Gawor J., & Petelin M. 2017. Evaluation of complete blood count indices (NLR, PLR, MPV/PLT, and PLCRi) in healthy dogs, dogs with periodontitis, and dogs with oropharyngeal tumors as potential biomarkers of systemic inflammatory response. *Journal of veterinary dentistry*, 34(4), 231-240. <doi:10.1177/0898756417731775>

Resende C. B., Borges I., Gonçalves W. A., Carneiro R., Rezende B. M., Pinho V., Teixeira M. M. 2020. Neutrophil activity in sepsis: a systematic review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 53. <doi: <https://doi.org/10.1590/1414-431X20207851>>

Riché F., Gayat E., Barthélémy R., Le Dorze M., Matéo J., Payen D. 2015. Reversal of neutrophil-to-lymphocyte count ratio in early versus late death from septic shock. *Critical Care*, 19(1), 1-10. <doi:10.1186/s13054-015-1144-x>

Santana C. H. & Santos R. L. 2021. Canine pyometra—an update and revision of diagnostic terminology. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 14(1), 1-8. <doi : 10.24070/bjvp.1983-0246.v14i1p1-8>

Schrijver I. T., Théroude C., Roger, T. 2019. Myeloid-derived suppressor cells in sepsis. *Frontiers in immunology*, 10, 327. <doi : 10.1155/2014/598654>

Şereflican M., Şereflican B., Tuman B., Göksügür N., Kesgin S., Yurttaş V. 2016. Evaluation of mean platelet volume and neutrophil to lymphocyte ratio as a diagnostic indicator in patients with recurrent aphthous stomatitis. *ENT updates*. <doi : 10.2399/jmu.2016002008>

Shah S. A., Sood N. K., Wani B. M., Rather M. A., Beigh A. B., & Amin U. 2017. Haemato-biochemical studies in canine pyometra. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(4): 14-17.

Shen Y., Huang X., Zhang W. 2019. Platelet-to-lymphocyte ratio as a prognostic predictor of mortality for sepsis: interaction effect with disease severity—a retrospective study. *BMJ open*, 9(1), e022896.

Shen X., Cao K., Zhao Y., Du J. 2021. Targeting neutrophils in sepsis: From mechanism to translation. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 644270. <doi : 10.1136/bmjopen-2018-022896>

Shubin N. J., Monaghan S. F., Heffernan D. S., Chung C. S., Ayala A. 2013. B and T lymphocyte attenuator expression on CD4+ T-cells associates with sepsis and subsequent infections in ICU patients. *Critical care*, 17(6), 1-11. <doi : 10.1186/cc13131>

Singer M., Deutschman C. S., Seymour C. W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G. R., Chiche J., Coopersmith M. C., Hotchkiss R. S., Levy M. M., Marshall J. C., Martin G. S., Opal S. M., Rubenfeld G. D., van der Poll T., Vincent J., Angus D. C. 2016. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *Jama*, 315(8), 801-810. <doi:10.1001/jama.2016.0287>

Sonego F., Castanheira F. V. E. S., Ferreira R. G., Kanashiro A., Leite C. A. V. G., Nascimento D. C., Colón D. F., Borges V. F., Alves-Filho J. C., Cunha F. Q. 2016. Paradoxical roles of the neutrophil in sepsis: protective and deleterious. *Frontiers in immunology*, 7, 155. <doi : 10.3389/fimmu.2016.00155>

Song M., Graubard B. I., Rabkin C. S., Engels E. A. 2021. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and mortality in the United States general population. *Scientific Reports*, 11(1), 1-9. <doi : 10.1038/s41598-020-79431-7>

Smith, F. O. 2006. Canine pyometra. *Theriogenology*, 66(3), 610-612. <DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.04.023>

Ward N. S., Casserly B., & Ayala A. 2008. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clinics in chest medicine*, 29(4), 617-625. <doi : 10.1016/j.ccm.2008.06.010>

Uçmak G. Z., Kurban İ., Uçmak M. 2021. Assessment of Hematological Parameters and Uterine Hemodynamic Indices in Bitches with Pyometra. *Acta Scientiae Veterinariae*, 49. <doi : https://doi.org/10.22456/1679-9216.111676>

Vincent J. L., Moreno R., Takala J., Willatts S., De Mendonça A., Bruining H., Reinhart C. K., Suter P. M., Thijs L. G. 1996. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Medicine*, 22, 707-710. <doi : 10.1007/bf01709751>

Volpato R. 2011. Avaliação clínica e imunoistoquímica do útero e cérvix de cadelas com o diagnóstico de piometra. Botucatu. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 113p.

Youden W. J. 1950. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*, 3(1), 32-35. <doi : 10.1002/1097-0142(1950)3:1<32::aid-cncr2820030106>3.0.co;2-3>

Zhang Y., Lu J. J., Du Y. P., Feng C. X., Wang L. Q., Chen M. B. 2018. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in gastric cancer. *Medicine*, 97(12). <doi : 10.1097/md.00000000000010144>