



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCOS CEZAR SANT' ANNA

**AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS URINÁRIAS NA DETECÇÃO
PRECOCE DA LESÃO RENAL EM CADELAS COM
PIOMETRA**

Londrina
2017

MARCOS CEZAR SANT' ANNA

**AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS URINÁRIAS NA DETECÇÃO
PRECOCE DA LESÃO RENAL EM CADELAS COM
PIOMETRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins

Londrina
2017

MARCOS CEZAR SANT' ANNA

**AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS URINÁRIAS NA DETECÇÃO
PRECOCE DA LESÃO RENAL EM CADELAS COM PIOMETRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa.Dra. Fabiana Ferreira de Souza
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo - FMVZ/UNESP
Campus Botucatu

Profa. Dra. Lucienne Garcia Pretto Giordano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra Patrícia Mendes Pereira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa.Dr. Lucas Alécio Gomes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 16 de fevereiro de 2017.

DEDICO

Dedico esse trabalho a minha esposa, Adriane e meu filho Caio, pelo apoio do início ao fim e por compreender a importância dessa jornada na minha vida e ciente que o sacrifício deles durante esse tempo foi igual ou maior que o meu e fundamental para a conclusão desse trabalho.

Dedico esse trabalho também aos meus pais, Cezar e Linda, pelo amor incondicional e pelo apoio aos estudos, tornando tudo na minha vida possível com muito esforço, dedicação e amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por me colocar desde meu nascimento no lugar certo com as pessoas certas e pelo maior presente da minha vida, meu filho Caio, a bênção de nossas vidas.

Meus pais, Cezar e Linda pelo amor da infância, amor e paciência da adolescência e amor e companheirismo na vida adulta.

Minha amada esposa Adriane por permancer ao meu lado sempre, construindo um lar amável que vai durar além da vida.

A professora Dra. Maria Isabel Mello Martins pela orientação e amizade durante essa jornada que teve início na residência, passando pelo mestrado e agora no doutorado, espero levar essa amizade e maternidade científica para sempre. Meus eternos agradecimentos por fazer parte da minha vida e da minha família.

Aos membros da comissão examinadora da banca de qualificação e defesa, professora Dra. Fabiana Ferreira de Souza, professora Dra. Patrícia Mendes Pereira, professora Dra. Karina Keller M. da Costa Flaiban, professor Dr. Lucas Alécio Gomes e professora Dra. Lucienne Garcia Pretto Giordano pela contribuição com esse trabalho e também pelo carinho com que todos sempre me trataram quando precisei de ajuda, e não foram poucas.

A Universidade Estadual de Londrina e todos os professores do curso de Medicina Veterinária com quem tive contato, por sempre ter sido muito bem acolhido e amparado.

Aos professores da Pós-graduação em Ciência Animal da UEL pelos ensinamentos e contribuições com esse trabalho durante as disciplinas.

Aos colegas da Pós-graduação pela convivência durante as disciplinas e troca de experiência durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos de trabalho do Hospital Veterinário da UniFil, que além da amizade e boa convivência, me ajudaram muito no desenvolvimento prático desse trabalho.

Ao pessoal do laboratório de reprodução de pequenos animais da Unesp de Botucatu, pela forma com que me receberam, me ajudaram e me ensinaram enquanto estive lá. Principalmente a professora Dra. Fabiana Ferreira de Souza, que possibilitou o desenvolvimento das proteômicas desse trabalho e sempre se mostrou muito solícita em me ajudar. E claro, minha amiga Cristiane Sella Paranzini pelos diversos favores que só amigos de verdade o fazem.

Aos amigos em geral, que mesmo não fazendo parte diretamente desse trabalho, são pessoas que sempre me incentivam a continuar e me proporcionam ótimos momentos, afinal, o que seria a vida sem eles?

A todos os meus pacientes, que contribuem para o meu desenvolvimento profissional e me forçam a não parar de estudar nunca, nem um dia sequer. O maior objetivo desse trabalho são vocês.

A todos que de alguma forma contribuíram com esse trabalho.

Muito obrigado.

“A leitura após certa idade distrai excessivamente o espírito humano das suas reflexões criadoras. Todo homem que lê demais e usa o cérebro de menos adquire a preguiça de pensar”.

Albert Einstein

SANT' ANNA, Marcos Cezar. **Avaliação de proteínas urinárias na detecção precoce da lesão renal em cadelas com piometra**. 2017. 75f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A piometra tem caráter multissistêmico e acomete cadelas adultas e idosas, geralmente durante o diestro. A insuficiência renal, durante a piometra, é um dos fatores mais importantes do prognóstico dessa afecção e a avaliação da proteômica urinária permite identificar biomarcadores de lesão renal precoce. Esse estudo objetivou avaliar o uso da relação proteína/creatinina urinária para a identificação de lesão renal antes do desenvolvimento da azotemia e identificar as proteínas urinárias presentes em cadelas com piometra com potencial para serem utilizadas como biomarcadores de lesão renal. Foram incluídas na pesquisa 44 cadelas com piometra, azotêmicas e não azotêmicas, e 12 cadelas que não apresentavam alterações sistêmicas. O primeiro artigo comparou cadelas com piometra e azotêmicas (A, n = 15, creatinina > 1,7), com não azotêmicas (NA, n = 29) e cadelas sem alterações sistêmicas que formaram o grupo controle (GC, n = 12). Todas as cadelas passaram por coleta de sangue e urina para hemograma completo, perfil bioquímico, urinálise e dosagem da proteína e creatinina urinária. As cadelas que apresentaram sedimento urinário ativo, ou seja, mais que cinco leucócitos ou hemácias por campo não foram utilizadas para a avaliação da relação proteína/creatinina urinária (UPC). Os valores da UPC foram superiores nas cadelas dos grupos NA e A quando comparadas com o GC ($p < 0,05$), o que mostra que a UPC pode detectar lesão renal em cadelas com piometra antes do desenvolvimento da azotemia. A leucocitose foi mais evidente nas cadelas do grupo A do que nos demais grupos, o que evidencia que a resposta inflamatória pode estar relacionada ao agravamento da doença renal. O segundo artigo estudou 32 cadelas com piometra e 12 cadelas sem alterações sistêmicas. Foi realizada espectrometria de massas do *pool* das amostras de urina dos grupos, piometra por bactérias gram-negativas não azotêmica (GnegNA, n = 18), gram-negativas azotêmicas (GnegA, n = 6), gram-positivas não azotêmicas (GposNA, n = 4), gram-positivas azotêmicas (GposA, n = 4) e grupo controle (GC, n = 12). As principais proteínas identificadas nos grupos de cadelas com piometra e não identificadas no GC, portanto, com potencial para biomarcadores de lesão renal precoce foram a clusterina, hepcidina, Ig Kappa cadeia V, lisozima C, proteína ligadora de retinol (RBP), amiloide sérica A, proteína de domínio central de quatro disulfetos WAP e a uromodulina, sendo que, a maioria dessas proteínas possuem massa molecular menor que a albumina (69 kDa), o que sugere lesão no compartimento tubular renal. Os resultados obtidos possibilitaram concluir que a UPC pode ser utilizada para detectar lesão renal em cadelas com piometra antes da azotemia e pode ser utilizada como exame controle durante o período pós operatório para detectar proteinúria persistente e permitir o tratamento precoce da insuficiência renal, contribuindo para qualidade de vida. O estudo proteômico da urina permitiu a identificação de proteínas com potencial para serem utilizadas como biomarcadores de lesão renal precoce e definiu que a lesão renal em cadelas com piometra é principalmente tubular e não glomerular como consta na maioria da literatura vigente.

Palavras-chave: Insuficiência renal. Espectrometria de massas. Hiperplasia endometrial cística. Canina.

SANT' ANNA, Marcos Cezar. **Proteomic urinary as a method of identifying biomarkers of early renal damage in bitches with pyometra.** 2017. 75f. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Pyometra has multisystemic disease and affect adult and old bitches during diestrus. Renal insufficiency during pyometra is one of the most important factors in the prognosis and the evaluation of urinary proteomics allows the identification of biomarkers of early renal damage, however, few studies in this sense in veterinary medicine. This study aimed to evaluate the use of the protein-to-creatinine ratio in urinary for the identification of renal injury before the development of azotemia and identify the urinary proteins present in bitches with pyometra to be used as biomarkers of renal injury. Thirty-four bitches with pyometra, azotemic and non-azotemic and 12 bitches with no systemic alterations were included in the study. The first article evaluate the use of the urinary protein-to-creatinine ratio (UPC) in clinical routine. 44 bitches with pyometra azotemics (A, n = 15, creatinine > 1.7), non-azotemic (NA, n = 29) and bitches without systemic alterations that formed the control group (GC, n = 12). All bitches underwent blood and urine collection for complete blood count, biochemical profile, urinalysis and protein and urine creatinine dosage. Bitches that had active urinary sediment, more than five leukocytes or erythrocytes per field were not used for urinary protein/creatinine UPC evaluation. The UPC values were higher in the bitches of the PNA and PA groups when compared to the CG ($p < 0.05$). Which shows that UPC can detect renal injury in bitches with pyometra before the development of azotemia. The leukocytosis was more evident in the group A than in the other groups, which shows that the inflammatory response may be related to the aggravation of renal disease. The second paper studied 32 bitches with pyometra and 12 bitches without systemic alterations. Mass spectrometry of the pool of urine samples of the following groups, pyometra by Gram negative and non-azotemic (GnegNA, n = 18), Gram negative azotemic (GnegA, n = 6), Gram positive non-azotemic (GposNa, n = 4), Gram positive azotemic (GposA, n = 4) and control (GC, n = 12). The major proteins identified in the groups of bitches with pyometra and unidentified in the GC, therefore, with potential for biomarkers of early renal damage were clusterin, hepcidin, Ig Kappa chain V, lysozyme C, retinol binding protein, serum amyloid A, WAP four-disulfide core domain protein 2 and uromodulin. Most of these proteins have a lower molecular weight than albumin (69 kDa), suggesting damage to the renal tubular compartment. The results obtained allow us to conclude that UPC can be used to detect renal lesions in bitches with pyometra prior to azotemia and can be used as a control test during the postoperative period to detect persistent proteinuria and allow early treatment in these patients, improving survival and quality of life. The proteomic study of urine allowed the identification of proteins with potential to be used as biomarkers of early renal damage and defined that kidney injury in bitches with pyometra is mainly tubular and non-glomerular as found in most of the current literature.

Key words: Renal injury. Mass spectrometry. Cystic endometrial hyperplasia. Canine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Distribuição do processo biológico, componente celular e função molecular das proteínas identificadas na urina de cadelas com piometra e do grupo controle.. 62
- Figura 2** - Distribuição da função molecular e processo biológico das proteínas identificadas como possíveis marcadores de lesão renal precoce em cadelas com piometra..... 67

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Tabela 1 -** Variáveis do eritrograma, expressadas em média e desvio padrão e leucocitárias, expressadas em mediana, mínimo e máxima e comparadas entre os grupos cadelas com piometra não azotêmicas, piometra azotêmicas e controle 44
- Tabela 2 -** Variáveis bioquímicas expressadas em mediana mínimo e máxima e comparadas entre os grupos piometra não azotêmicas, piometra azotêmicas e controle 45
- Tabela 3 -** Parâmetros urinários, expressados em mediana mínimo e máximo e comparadas entre os grupos piometra não azotêmicas, piometra azotêmicas e controle 47

ARTIGO 2

- Tabela 1 -** Relação das proteínas urinárias identificadas, sua massa molecular e distribuição entre os grupos Gram-negativas não azotêmicas (GnegNA), Gram-negativas Azotêmicas (GnegA), Gram-positivas não azotêmicas (GposNA), Gram-positivas azotêmicas (GposA) e controle..... 64

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ALT	Alamino aminotransferase
AMBP	Imunoglobulina precursor microglobulina/bikunina
FA	Fosfatase alcalina
FSH	Hormônio folículo estimulante
GC	Grupo controle
GGT	Gama glutamil transferase
GnegA	Gram-negativa azotêmicas
GnegNA	Gram-negativa não azotêmicas
GposA	Gram-positivas azotêmicas
GposNA	Gram-positvas não azotêmicas
IgG	Imunoglobulina G
LH	Hormônio luteinizante
MW	Massa molecular
NAG	N-Acetil-B-D-glucosaminidase
OH	Ovariohisterectomia
PA	Piometra azotêmicas
PCR	Proteína C reativa
PD	Polidipsia
PNA	Piometra não azotêmicas
PU	Poliúria
RBP	Proteína ligadora de retinol
UPC	Relação proteína/creatinina urinária
XLHN	Nefropatia hereditária ligada ao cromossomo X

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	FISIOLOGIA DO TRATO REPRODUTIVO DA CADELA	14
2.2	PATOGENIA DA PIOMETRA CANINA	15
2.2.1	Papel Hormonal na Patogenia da Piometra	15
2.2.2	Etiologia Bacteriana na Piometra	16
2.3	SINAIS CLÍNICOS, PARÂMETROS LABORATORIAIS DE ROTINA E DIAGNÓSTICO	17
2.4	TRATAMENTO.....	19
2.5	LESÃO RENAL SECUNDÁRIA A PIOMETRA CANINA.....	20
2.6	BIOMARCADORES DE LESÃO RENAL NA PIOMETRA	21
2.7	PROTEÔMICA URINÁRIA NA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE LESÃO RENAL.....	25
2.8	PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS COM POTENCIAL PARA BIOMARCADORES DE LESÃO RENAL EM CADELAS COM PIOMETRA.....	26
	REFERÊNCIAS	28
3	HIPÓTESE	35
4	OBJETIVO	36
5	ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	37
	ARTIGO 1: Uso da Relação Proteína/Creatinina Urinária no Diagnóstico Precoce da Lesão Renal em Cadelas com Piometra	37
	Resumo	37
	Abstract	38
	Introdução	39
	Material e Métodos.....	40
	<i>Animais</i>	40
	<i>Hematologia, exames bioquímico e UPC</i>	41

<i>Análise estatística</i>	42
Resultados e Discussão.....	42
Conclusão	47
Referências	48

ARTIGO 2: Proteômica Urinária como Ferramenta para Identificação

Biomarcadores de Lesão Renal Precoce em Cadelas com Piometra	54
Resumo	54
Abstract	55
Introdução	56
Material e Métodos.....	57
<i>Animais</i>	57
<i>Espectrometria de massas</i>	58
<i>Dosagem de proteínas totais</i>	58
<i>Digestão proteica em solução</i>	59
<i>Dessalinização de peptídeos</i>	59
<i>Sequenciamento peptídico por LC-ESI QTOF</i>	60
Resultados e Discussão.....	61
Conclusão	67
Referências	68

CONCLUSÕES..... 73

APÊNDICE A Proteínas urinárias identificadas em cadelas com piometra e sua respectiva ontologia gênica (função molecular, processo biológico, componente celular) obtida no banco de dados UNIPROT (www.uniprot.org).....	74
---	----

1 1 INTRODUÇÃO

2
3 A cadela possui diversas particularidades no ciclo estral, mas a principal é a
4 produção da progesterona durante 60 a 90 dias após o estro, evento fundamental no
5 surgimento da piometra, pois durante o diestro a imunossupressão intrauterina ocasionada
6 pela progesterona favorece a multiplicação bacteriana, principalmente em cadelas com
7 hiperplasia endometrial cística (FELDMAN; NELSON, 1996; JOHNSTON et al., 2001).

8 Os sinais clínicos da piometra como poliúria e polidipsia, anorexia, vômito e
9 prostração sugerem o caráter sistêmico infeccioso da doença, sendo a *Escherichia coli* a
10 principal bactéria envolvida e responsável por desencadear a síndrome da resposta
11 inflamatória sistêmica (WEISS et al., 2004; VERSTEGEN et al., 2008; KUPLULU et al.,
12 2009; BASSESSAR; VERMA; SWAMY, 2013).

13 O tratamento cirúrgico por ovariohisterectomia é o que confere o melhor
14 prognóstico, mas o tratamento médico com antagonistas direto ou indireto da progesterona e
15 associação de múltiplos fármacos contribuem para eficácia do tratamento medicamentoso
16 com menos efeitos adversos (BATISTA; BLANCO; GOBELO, 2015).

17 A lesão renal induzida durante a piometra é fator importante na morbidade e
18 mortalidade das pacientes acometidas, já que, aquelas tratadas e que se recuperam do quadro
19 infeccioso e inflamatório podem ter dano renal permanente, prejudicando sua sobrevivência e
20 qualidade de vida (JOHNSTON et al., 2001; FIENI, 2006).

21 Biomarcadores de lesão renal já consagrados ou em processo de validação
22 na medicina veterinária e humana associados a histopatologia renal foram estudados em
23 cadelas com piometra. Tais estudos identificaram sinais de lesão renal mista, tanto glomerular
24 como tubular, confrontando a literatura disponível que descreve a glomerulonefrite como
25 principal lesão renal na piometra canina (ZARAGOZA et al., 2004; HEIENE et al., 2007;
26 MADDENS et al., 2011). Desta maneira, são necessários estudos com a finalidade de
27 identificar novos biomarcadores de lesão renal na piometra que possa indicar lesão precoce e
28 diagnosticar o compartimento renal acometido como glomerular, tubular ou ambos.

29 As principais proteínas urinárias utilizadas como marcadores de lesão
30 glomerular em cadelas com piometra são a albumina, imunoglobulinas e proteína C reativa e
31 para detectar lesão tubular a proteína ligadora de retinol (MADDENS et al., 2011). Outras
32 proteínas identificadas em estudos proteômicos com potencial como marcadores de lesão
33 renal em cães são a hemopexina, apolipoproteína A1, percalan, haptoglobina, microglobulina
34 beta-2, fetuina-B, superóxido dismutase dentre outras (NARBY et al., 2011; PALVIAINEN et

1 al., 2012).

2 Essa revisão tem como objetivo descrever conceitos da piometra canina e
3 contextualizar a patogenia da lesão renal desencadeada pela piometra, o uso de biomarcadores
4 de lesão renal na piometra canina e a proteômica urinária como fonte de novos
5 biomarcadores.

6

7

8

9

10

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FISIOLOGIA DO TRATO REPRODUTIVO DA CADELA

O trato reprodutivo da cadela sofre modificações estruturais após a puberdade e a cada novo ciclo estral, mediadas por hormônios sexuais, estrógeno e progesterona, com a finalidade de preparar o trato genital para cópula, fecundação e gestação. É composto anatomicamente pelos ovários, tuba uterina, útero, cérvix, vagina, vestíbulo vaginal e vulva (ELLENPORT, 1986; FELDMAN; NELSON, 1996; JOHNSTON et al., 2001).

A cadela é monoéstrica preferencialmente não estacional, com intervalo longo entre cada fase folicular e ovulação espontânea (HOFFMANN; RIESENBECK; KLEIN, 1996; CONCANNON, 2011).

O ciclo estral da cadela pode ser dividido em quatro fases: anestro, proestro, estro e diestro. Cada uma das fases possui características hormonais distintas. O eixo hipotálamo-hipófise-ovariano funciona de forma sincronizada com hormônios sexuais que são produzidos pelos ovários e responsáveis pelas mudanças anatômicas observadas, principalmente no útero, vagina, vestíbulo e vulva (JOHNSTON et al., 2001; ROOT KUSTRITZ, 2012).

O anestro é um período de pouca atividade hormonal, marcado pela presença de pequenas pulsações de gonadotrofinas, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) produzidos pela hipófise. No proestro o FSH estimula o crescimento folicular nos ovários, que por sua vez, produz estrógeno. Essa fase tem como característica as mudanças do trato reprodutivo mediadas pelo estrógeno a hiperplasia do epitélio vestibular e vaginal, o relaxamento da cérvix e o desenvolvimento das glândulas endometriais. Quando a produção de estrógeno atinge seu pico antes da ovulação, ocorre luteinização prévia de seus folículos e produção de progesterona. Essa fase é denominada estro, o período de fertilidade da cadela, sendo marcado pela ovulação. Outra particularidade da cadela é a ovulação do oócito imaturo, sendo necessária maturação na tuba uterina antes da fertilização. No diestro, as concentrações de estrógenos voltam para níveis basais e a concentração de progesterona continua a se elevar, atingindo seu platô e permanecendo elevada por aproximadamente 60 dias, nas cadelas gestantes ou até 100 dias nas não gestantes tendo como principais ações o fechamento da cérvix, a imunomodulação intrauterina, e o

1 desenvolvimento da glândula mamária. O diestro não gestacional é a principal particularidade
2 do ciclo estral da cadela, pois é fator primordial no desenvolvimento da piometra canina
3 (FELDMAN; NELSON, 1996; JOHNSTON et al., 2001; CONCANNON, 2011; ROOT
4 KUSTRITZ, 2012).

6 2.2 PATOGENIA DA PIOMETRA CANINA

8 O desenvolvimento da piometra canina está relacionado com um complexo
9 conjunto de fatores etiológicos, que inclui a influência hormonal no meio ambiente uterino e
10 vaginal, virulência da bactéria infectante, resposta individual no combate à infecção e na
11 sensibilidade aos produtos bacterianos e inflamatórios ligados a doença (HAGMAN, 2004).

13 2.2.1 Papel Hormonal na Patogenia da Piometra

15 A progesterona é crucial no desenvolvimento da piometra, fato provado por
16 um estudo que quando inoculou bactérias no útero de cadelas durante a fase estrogênica. A
17 indução experimental da doença não foi satisfatória. Por outro lado, quando a contaminação
18 uterina experimental ocorreu na fase progesterônica o útero tornou-se susceptível à infecção
19 (HAGMAN, 2016).

20 O estrógeno também tem papel importante na patogenia da piometra, pois
21 estimula a hiperplasia endometrial e sensibiliza os receptores endometriais a progesterona.
22 Devido à estimulação crônica dos estrógenos sobre o endométrio, a hiperplasia fisiológica é
23 intensificada e os ductos secretores das glândulas endometriais são obliterados,
24 desencadeando a hiperplasia endometrial cística, uma condição prévia ao desenvolvimento da
25 piometra, e a justificativa da maior ocorrência em cadelas adultas e idosas (PRETZER, 2008).

26 Durante o estro, bactérias da microbiota vaginal tem acesso ao útero, e
27 embora isso ocorra em todo estro, somente quando a bactéria contaminante encontra um
28 ambiente favorável para multiplicação, isso é, a hiperplasia endometrial cística e
29 imunossupressão mediada pela progesterona, é que a infecção ocorre. Por isso a interação
30 estrógeno, progesterona e bactéria é importante para o desenvolvimento da piometra
31 (FELDMAN, 2004; VERSTEGEN et al., 2008).

32 Embora a importância da progesterona no desenvolvimento da piometra seja
33 bem aceita, seu mecanismo ainda não está totalmente elucidado. Estudos epidemiológicos
34 conduzidos nos anos 90, não encontraram associação entre altas concentrações ou períodos

1 prolongados de secreção da progesterona com a piometra canina (NISKANEN;
2 THRUSFIELD, 1998). Enquanto outros estudos apontam uma resposta exacerbada do
3 endométrio aos hormônios ovarianos como possível explicação para a não diferença nos
4 níveis hormonais em cadelas com e sem piometra durante o diestro (DE BOSSCHERE et al.,
5 2002; HAGMAN, 2004; HAGMAN, 2016).

6 7 2.2.2 Etiologia Bacteriana na Piometra

8
9 A principal bactéria reportada como agente etiológico da piometra canina é
10 a *Escherichia coli*. Entretanto, *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Klebsiella* spp,
11 *Pseudomonas* spp, *Proteus* spp, *Haemophilus* spp, *Serratia* spp entre outras bactérias foram
12 isoladas em diferentes proporções de úteros de cadelas com piometra (WEISS et al., 2004;
13 VERSTEGEN et al., 2008; KUPLULU et al., 2009; BASSESSAR; VERMA; SWAMY,
14 2013; SANT' ANNA et al., 2014).

15 A principal origem das bactérias isoladas do útero de cadelas com piometra
16 é a microbiota vaginal e não a transmissão de uma cadela para outra (HAGMAN; KUHN,
17 2002). Entretanto, algumas bactérias são mais ou menos patogênicas de acordo com a
18 presença ou não de fatores de virulência. Partindo desse princípio, vacinas para neutralizar os
19 fatores de virulência da *E. coli*, estão sendo pesquisada (HAGMAN, 2016).

20 É marcante a diversidade etiológica de bactérias isoladas de cadelas com
21 piometra em estudos nacionais (SANT' ANNA et al., 2014), principalmente quando
22 comparado com estudos em países do hemisfério norte. No Brasil, a *E. coli* também aparece
23 como principal agente isolado, com prevalência variando de 40 a 50% (OLIVEIRA et al.,
24 1988). Já, estudos europeus, geralmente encontraram prevalência próxima a 90%
25 (FRANSSON, 2003; EMANUELLI et al., 2010; BASSESSAR; VERMA; SWAMY, 2013).

26 Outras bactérias isoladas com certa representatividade podem ser divididas
27 em Gram-positivas, sendo as principais *Streptococcus* spp e *Staphylococcus* spp, e Gram-
28 negativas além da *E. coli* como, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas* spp e *Proteus* spp (WEISS et
29 al., 2004; SANT ANNA et al., 2014).

30 A alta prevalência de *E. coli* em infecções uterinas, provavelmente, esteja
31 ligada à sua capacidade em aderir-se em sítios antigênicos específicos no endométrio canino
32 que está sob influência da progesterona (GROOTERS, 1994).

33 A *E. coli* uropatogênica é conhecida por apresentar fatores de virulência
34 que as diferem das *E. coli* intestinais. Tais fatores de virulência também são encontrados em

1 isolados de piometra e conferem maior patogenicidade a bactéria, facilitando sua aderência e
2 multiplicação em tecidos extra intestinais (JOHNSON et al. 1998; HAGMAN; KUHN, 2002).

3 Alguns genes, responsáveis pela síntese de fatores de virulência foram
4 identificados e associados a alteração. Os genes *pili* associado a pielonefrite (*pap*), fímbria
5 tipo I (*fim*), fímbria S (*sfa*) facilitam a colonização do epitélio urogenital. Os genes α –
6 hemolisina (*hlya*) e o fator citotóxico necrosante I (*cnfl*) aumentam o dano tecidual durante a
7 infecção. A prevalência do gene *pap* tem sido significativamente maior em *E. coli* isoladas de
8 cadelas com piometra do que *E. coli* isoladas de fezes de cães assintomáticos (ARTHUR et
9 al., 1989; CHEN et al., 2003; QUINN et al. 2005).

10 Estafilococos e estreptococos são as principais bactérias Gram-positivas
11 isoladas do conteúdo uterino em cadelas com piometra (VERSTEGEN et al., 2008).
12 Entretanto, pouca importância tem sido dada na identificação dos mecanismos envolvidos na
13 sepse, por tais bactérias, na literatura veterinária (SPECHT et al., 2002).

14 O principal mecanismo que o *Staphylococcus* spp pode desencadear é o
15 choque séptico pela liberação de componentes da parede celular que estimulam a liberação de
16 componentes inflamatórios. Esse mecanismo é similar ao que acontece com infecções por
17 bactérias Gram-negativas. Um segundo mecanismo é pela produção de enterotoxinas que
18 poderiam desencadear uma síndrome do choque tóxico (SPECHT et al., 2002; COX, 2006).

19 Os estreptococos são capazes de causar infecção piogênica em muitos
20 animais, geralmente são oportunistas e podem acometer o trato genital (QUINN et al., 2005).
21 A classificação proposta por Lancefield (1933) para classificar os estreptococos é baseada nas
22 diferenças antigênicas de carboidratos da parede celular e está correlacionada com sua
23 patogenicidade. Os grupos β -hemolíticos tendem a ser mais patogênicos (GREENE;
24 PRESCOTT, 2006).

25 O peptidoglicano é o maior componente da parede celular de bactérias
26 Gram-positivas como estafilococos e estreptococos e atualmente é aceito como o principal
27 mecanismo da resposta inflamatória na sepse causadas por bactérias Gram-positivas.
28 Induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias em células do sistema imune após
29 ligação com receptor extracelular (SUN et al., 2012).

31 2.3 SINAIS CLÍNICOS, PARÂMETROS LABORATORIAIS DE ROTINA E DIAGNÓSTICO

32
33 A piometra pode ser classificada de acordo com o *status* da cérvix uterina, a
34 depender se a cérvix se encontra aberta ou fechada no momento do diagnóstico, resultando na

1 existência do corrimento vulvar. Os sinais clínicos, devido à infecção do útero, tendem a ser
2 mais graves quando a secreção uterina não é drenada (JOHNSON, 2006).

3 As principais alterações durante o exame clínico compatíveis com piometra
4 são depressão, desidratação, febre ou hipotermia, organomegalia abdominal, secreção vulvar e
5 uveíte. Geralmente, na anamnese é relatado estro recente, apatia, hiporexia, poliúria e
6 polidipsia. Em casos graves, sinais de síndrome da resposta inflamatória sistêmica podem ser
7 notados, como taquicardia, taquipneia, pulso femoral fraco e hipotermia (FELDMAN, 2004;
8 PRETZER, 2008).

9 Alterações nos parâmetros vitais representam mecanismos compensatórios
10 em decorrência da produção de mediadores inflamatórios devido a infecção e consequente
11 hipotensão. A uveíte quando presente, é devido a deposição de imunocomplexos. Por outro
12 lado, a presença de poliúria reflete a perda da capacidade dos túbulos renais em reabsorver
13 água (JOHNSTON et al., 2001; FIENI, 2006).

14 No hemograma, as anormalidades mais consistentes encontradas são
15 leucocitose por neutrofilia com desvio à esquerda, secundária a infecção, e discreta anemia
16 normocítica normocrômica arregenerativa, resultante da doença inflamatória crônica que
17 promove supressão da medula óssea (PRETZER, 2008).

18 As anormalidades bioquímicas incluem hiperproteinemia,
19 hiperglobulinemia e azotemia. Ocasionalmente, as atividades da alanina aminotransferase
20 (ALT) e da fosfatase alcalina (FA) estão moderadas a intensamente elevadas, supostamente
21 em razão da septicemia e hipóxia (JOHNSON, 2006).

22 A piometra causada por *E. coli* pode estar associada à insuficiência renal,
23 secundária à uma glomerulonefrite por depósitos de imunocomplexos na membrana basal do
24 glomérulo, e agravada pela azotemia pré-renal, consequente à desidratação associada ao
25 choque séptico (FIENI, 2006). Esse mecanismo de lesão renal tem sido contestado e
26 discutido, uma vez que, estudos tem encontrado evidências de lesão tubulointerstitial
27 importante em cadelas com piometra, e ao mesmo tempo, alterações glomerulares
28 semelhantes em cadelas de mesma faixa etária (ZARAGOZA et al., 2004; HEIENE et al.,
29 2007; MADDENS et al., 2011).

30 Os achados durante o exame clínico devem ser interpretados de forma
31 conjunta com os exames laboratoriais de rotina, como hemograma e bioquímicos, e exames de
32 imagem como a ultrassonografia abdominal (JOHNSTON et al. 2001; FIENI, 2006).

33 A secreção vulvar deve ser diferenciada de secreção pós-parto, metrite pós-
34 parto e como sendo de origem vaginal. Na ausência de secreção vulvar, o diagnóstico é mais

1 difícil, mas é comum notar durante a palpação abdominal organomegalia tubular em região
2 mesogástrica. A piometra fechada é um impotante diagnóstico diferencial para cadelas no
3 diestro e com abdômem agudo (FIENI, 2006).

4 O diagnóstico presuntivo é baseado nos exames de imagem como
5 radiografia abdominal e ultrassonografia após suspeita no exame clínico. Se o exame
6 radiográfico revelar aumento uterino, é importante diferenciar da gestação em terço inicial
7 (antes que ocorra a mineralização fetal – 42 a 45 dias da ovulação). O exame
8 ultrassonográfico é o mais indicado para o diagnóstico de piometra, revelando aumento
9 uterino com conteúdo anecóico (PRETZER, 2008).

10 Embora os achados clínicos, laboratoriais de rotina e de imagens
11 supracitados forneçam subsídios para o diagnóstico na maioria dos casos, ainda é um desafio
12 diferenciar a hiperplasia endometrial cística/mucometra, da piometra no início do
13 desenvolvimento da doença (PRETZER, 2008). Quando os exames hematológicos não
14 revelam o processo inflamatório sistêmico, o aumento uterino identificado durante o exame
15 ultrassonográfico não consegue diferenciar as duas alterações com acurácia. Portanto, a
16 dosagem sérica de proteínas de fase aguda e o uso da ultrassonografia *doppler* dos vasos
17 uterinos podem auxiliar na diferenciação e, conseqüentemente, na tomada de decisão quanto
18 ao tratamento (BATISTA; BLANCO; GOBELLO, 2015; HAGMAN, 2016).

20 2.4 TRATAMENTO

21
22 A piometra canina pode ser tratada cirúrgica ou clinicamente. Entretanto, o
23 tratamento cirúrgico, a ovariectomia (OHE) é o que confere melhor prognóstico,
24 inclusive para cadelas com acometimento sistêmico grave. Sendo assim, o tratamento médico
25 fica destinado a cadelas jovens, com interesse reprodutivo e sinais sistêmicos discretos
26 (JOHNSTON et al., 2001; FELDMAN, 2004).

27 Em relação ao tratamento cirúrgico, cadelas com acometimento sistêmico
28 leve possuem melhor prognóstico. Cadelas em sepse e/ou choque devem ser estabilizadas
29 antes do procedimento por fluidoterapia intensiva, correção do desequilíbrio eletrolítico e uso
30 de antibiótico parenteral de amplo espectro. O procedimento deve ser realizado assim que os
31 parâmetros hemodinâmicos estejam aceitáveis, promovendo a remoção da fonte de infecção
32 (FELDMAN, 2004; HEDLUND, 2005).

33 Inicialmente, o tratamento clínico da piometra foi baseado no uso de
34 antibióticos. Entretanto, só promovia a atenuação dos sinais clínicos e outra intervenção era

1 sempre necessária (VERSTEGEN et al., 2008). Com o passar dos anos, novos fármacos foram
2 aplicados à reprodução canina, proporcionando resultados satisfatórios no tratamento clínico
3 da piometra (GOBELLO, 2006; BATISTA; BLANCO; GOBELLO, 2015).

4 O objetivo do tratamento farmacológico, quando somente o útero é
5 considerado, é antagonizar a progesterona por luteólise ou prevenir a sua ligação aos
6 receptores, promover o relaxamento da cérvix quando esta não se encontra patente e induzir a
7 contração uterina. Tais medidas são alcançadas com a combinação de prostaglandinas naturais
8 ou sintéticas, antagonistas da prolactina (agonistas dopaminérgicos), antagonistas
9 competitivos da progesterona e mais recentemente com o uso de agonistas do GnRH
10 (CORRADA et al., 2006; GOBELLO, 2006; VERSTEGEN et al., 2008; BATISTA;
11 BLANCO; GOBELLO, 2015). O prognóstico para o tratamento médico tem melhorado de
12 forma considerável com o uso de protocolos com as associações de fármacos, permitindo
13 menores doses com menos efeitos adversos (CORRADA et al., 2006).

15 2.5 LESÃO RENAL SECUNDÁRIA A PIOMETRA CANINA

17 A piometra é caracterizada por infecção bacteriana grave. A estimulação
18 crônica do sistema imune pelo excesso de antígeno da *E. coli* no útero induz a formação de
19 imunocomplexos que são depositados na membrana basal dos glomérulos causando
20 glomerulonefrite e insuficiência renal aguda (JOHNSTON et al., 2001; FIENI, 2006). A
21 passagem de proteínas plasmáticas pelo glomérulo causa a proteinúria que, em alguns casos,
22 pode ser persistente (ZARAGOZA et al., 2004; HEIENE et al., 2007). Por outro lado,
23 endotoxinas bacterianas suprimem a habilidade da alça de Henle em reabsorver sódio e
24 cloreto. As endotoxinas produzidas pela *E. coli* possuem capacidade específica de inibir a
25 resposta tubular ao hormônio antidiurético, ocorrendo a perda da capacidade do rim em
26 concentrar a urina. Isso é observado clinicamente pela poliúria e polidipsia compensatória
27 (VERSTEGEN et al., 2008).

28 Heiene et al. (2001) investigaram a enzímúria em cadelas com piometra e
29 descreveram sua relação com achados histopatológicos. Os níveis urinários de gama glutamil
30 transferase (GGT), FA e N-Acetil-B-D-glucosaminidase (NAG) estavam aumentados antes da
31 ovariectomia e diminuíram após a cirurgia e tratamento adequado. Tais enzimas,
32 quando presentes na urina foram relacionadas à lesão renal aguda tubular. Nesse estudo, os
33 autores também encontraram graves alterações morfológicas em células renais tubulares e
34 alterações glomerulares discretas, porém, não havia grupo controle. Mesmo assim, com

1 achados consistentes de dano renal tubular e discretas alterações glomerulares, sugeriram que
2 o conceito da glomerulonefrite, como lesão primária, fosse revisado.

3 Zaragoza et al. (2004) estudaram por meio de eletrofose em gel de
4 poliacrilamida a presença de proteínas urinárias de diferentes massas moleculares (MW) em
5 cadelas com piometra e cadelas saudáveis, e detectaram que cadelas com piometra apresentaram
6 grande quantidade de proteínas de baixa MW em relação as cadelas do grupo controle,
7 enquanto que proteínas de MW intermediária estavam presentes nos dois grupos. Levando em
8 consideração que na disfunção glomerular ocorre a passagem de proteínas de MW
9 intermediária, ou seja, acima de 69 kDa (albumina) e que nas lesões tubulares é observada a
10 presença de proteínas de baixa MW, novamente ficou sugerido que a principal lesão é tubular
11 e não glomerular nos casos de piometra.

12 Heiene et al. (2007) compararam alterações histopatológicas renais em
13 cadelas com piometra e cadelas saudáveis com mesma faixa etária. Não observaram qualquer
14 sinal de glomerulonefrite em ambos os grupos. Os autores enfatizam que a classificação usada
15 para determinar o tipo de lesão glomerular foi correta, e que estudos anteriores interpretavam
16 lesões compatíveis com glomerulosclerose como glomerulonefrite. Além disso, a maior
17 diferença entre os grupos foi a prevalência de infiltrado inflamatório intersticial,
18 acompanhado de fibrose intersticial e atrofia tubular.

19 Nesse contexto, Maddens et al. (2010, 2011) utilizaram biomarcadores de
20 lesão renal precoce pré estabelecidos para investigar a lesão renal na piometra. Para isso,
21 compararam biomarcadores urinários de lesão glomerular e tubular em cadelas com piometra
22 e grupo controle e observaram em cadelas não azotêmicas elevadas concentrações dos
23 biomarcadores utilizados em cadelas com piometra, tanto de marcadores de lesão renal
24 glomerular como tubular. Além disso, consideraram que tais marcadores são superiores na
25 detecção de lesão renal em comparação com testes usados na rotina, como a creatinina sérica e
26 a relação proteína creatinina/urinária (UPC), concluindo que a piometra pode causar dano
27 glomerular e tubular.

29 2.6 BIOMARCADORES DE LESÃO RENAL NA PIOMETRA

31 Em estudos que avaliaram a patogenia da lesão renal na piometra surgiu a
32 necessidade de novos biomarcadores, pois métodos de rotina são pouco sensíveis e não
33 detectam a localização da porção do néfron acometida.

34 Biomarcadores são moléculas fisiológicas, principalmente proteínas, que

1 aumentam ou diminuem em associação com um processo patológico. Na medicina veterinária
2 são poucos os biomarcadores urinários para detectar lesão renal utilizados na rotina prática
3 (PRESSLER, 2013).

4 Um biomarcador ideal para lesão renal deve ser capaz de detectar o dano
5 renal de forma precoce, localizar a lesão renal (glomerular, tubular ou ambos), diferenciar de
6 lesão pré-renal, pós-renal, renal e não-renal, prever a gravidade e ser capaz de monitorar
7 efeitos da intervenção terapêutica (DE LOOR et al., 2013).

8 Lesão renal aguda, geralmente é resultado de eventos tóxicos ou isquêmicos
9 e afetam a porção tubular do néfron. A doença renal crônica pode ser em decorrência de
10 doenças ou desordens que afetam qualquer porção do néfron, incluindo o suprimento
11 sanguíneo e o interstício, sendo a detecção precoce fundamental no sucesso do tratamento
12 (GRAUER, 2005).

13 A creatinina sérica e a urinálise são os métodos utilizados na prática clínica
14 para detectar e avaliar a extensão da lesão renal. Entretanto, o aumento sérico da creatinina e a
15 inabilidade renal em concentrar a urina só acontece após grave acometimento renal. Além de
16 serem métodos pouco sensíveis, não diferenciam dano renal tubular e glomerular
17 (PRESSLER, 2013).

18 A detecção de enzimas na urina como a GGT e NAG, tem se mostrado um
19 sensível marcador de lesão renal tubular precoce, pois são enzimas presentes nas bordas em
20 escova e no lisossomo dos túbulos proximais, respectivamente (GRAUER, 2005).

21 Em estudo com 25 cadelas com piometra e 14 cadelas controle, a relação
22 creatinina/NAG urinária foi superior nas cadelas com piometra, mostrando ser um possível
23 marcador de lesão renal tubular (MADDENS et al., 2010).

24 Outro estudo com 55 cadelas com piometra, mas sem grupo controle, que
25 avaliou a atividade da FA, GGT e NAG na urina antes e após o tratamento cirúrgico e
26 comparou com achados histopatológicos renais foi identificado aumento dos níveis das
27 enzimas estudadas antes e até três a quatro dias após a cirurgia, diminuindo de forma
28 significativa até o 12º dia, sugerindo dano tubular transitório. Na avaliação histopatológica o
29 achado mais consistente sugeriu lesão tubulointersticial (HEIENE et al., 2001).

30 O colágeno tipo IV da membrana basal da parede do capilar glomerular
31 restringe a filtração da maioria das proteínas plasmáticas, tendo principalmente como base a
32 MW e a carga elétrica. A albumina (69 kDa) e proteínas maiores não estão presentes em
33 grandes quantidades no filtrado glomerular devido a esta permeabilidade seletiva. A
34 membrana do capilar glomerular possui carga negativa, portanto, também impede a passagem

1 de proteínas com mesma carga, como a albumina. Proteínas de menor MW e aquelas maiores
2 mas com carga positiva passam pelo glomérulo, mas são reabsorvidas pelas células epiteliais
3 tubulares (GRAUER, 2011). Em condições fisiológicas, a urina poderia conter somente
4 pequenas quantidades de proteínas devido a este mecanismo. Portanto, as proteínas urinárias
5 que são identificadas podem sugerir a patogênese da lesão renal e/ou indicar proteínas com
6 potencial diagnóstico de lesão renal precoce (DE LOOR et al., 2013).

7 A proteinúria persistente com sedimento urinário inativo tem sido utilizado
8 como indicador de lesão glomerular e para determinar a gravidade da doença renal crônica em
9 cães e gatos (GRAUER, 2005). Para determinar a gravidade da proteinúria a relação UPC tem
10 sido usada na rotina clínica. Embora a UPC seja mais sensível para albumina, não é capaz de
11 detectar concentrações abaixo de 30mg/dL. Para isso, testes que podem detectar a albumina
12 em concentrações próximas a 1mg/dL (microalbuminúria) podem ser utilizados devido a sua
13 maior sensibilidade (GRAUER, 2011).

14 A proteinúria renal pode ser desencadeada pelo aumento da filtração
15 glomerular de proteínas plasmáticas associada à hipertensão intraglomerular, pela presença de
16 imunocomplexos, inflamação vascular nos capilares glomerulares ou defeito estrutural na
17 membrana basal do glomérulo. Além disso, a proteinúria pode ter origem tubular, tendo como
18 causa a diminuição da reabsorção tubular do filtrado plasmático. As lesões glomerulares
19 resultam em proteinúria mais grave do que lesões tubulointersticiais (GRAUER, 2011).
20 Geralmente cães são considerados proteinúricos quando $UPC > 0,5$. A UPC de 0,5 a 1
21 geralmente são associadas a proteinúria de origem tubular e $UPC > 1$ proteinúria glomerular
22 (GRAUER, 2011; DE LOOR et al., 2013).

23 Maddens et al. (2011) avaliaram seis marcadores de lesão renal precoce pré
24 estabelecidos em cadelas com piometra e compararam com cadelas saudáveis de mesma idade.
25 Os biomarcadores urinários foram IgG, proteína C reativa, albumina, proteína ligadora de
26 retinol (RBP) e NAG, todos foram expressos em relação a creatinina urinária e diferiram de
27 forma significativa do grupo controle. Vale ressaltar que a uréia e creatinina sérica não foram
28 diferente entre os grupos, o que reforça a detecção precoce da lesão renal em cadelas com
29 piometra. Dos marcadores utilizados, a IgG, proteína C reativa, albumina são marcadores de
30 lesão glomerular e a RBP e NAG são marcadores de lesão tubular.

31 A albumina foi a primeira candidata a biomarcador urinário e
32 extensivamente estudada em cães, e a microalbuminúria tem se mostrado um bom indicador
33 de disfunção glomerular precoce. Entretanto, levando em consideração que o córtex renal
34 recebe 90% do fluxo sanguíneo, o que torna essa região mais susceptível a ação de toxinas

1 presentes no sangue, e as células do túbulo proximal e do ramo ascendente da alça de Henle
2 são mais susceptíveis a lesão isquêmica devido a alta atividade metabólica, é possível
3 hipotetizar que proteínas de origem tubular e de baixa MW são bons biomarcadores de lesão
4 renal precoce (DE LOOR et al., 2013).

5 A imunoglobulina G (IgG), possui MW aproximada de 150 kDa, é
6 produzida pela ativação de linfócitos B e circula no plasma como parte do sistema imune
7 humoral. Por se tratar de uma proteína de alta MW, sua detecção na urina é associada a dano
8 glomerular grave e persistente em humanos. Seu uso como marcador de lesão renal aguda é
9 limitado, uma vez que, na doença renal de caráter agudo o segmento tubular é o mais
10 acometido (DE LOOR et al., 2013).

11 A proteína C reativa é uma proteína de alta MW, sintetizada pelo fígado
12 como parte da resposta de fase aguda após estimulação dos hepatócitos por citocinas pró-
13 inflamatória (interleucinas-6, interleucina-1 e fator de necrose tumoral). A presença de
14 proteínas de fase aguda aumentada no soro é indicativo de processo inflamatório ou
15 infeccioso (GEBHARDT et al., 2009). A relação proteína C reativa/creatinina urinária tem
16 sido relatada em cães com doença renal e piometra e tem sido avaliada em humanos. Essa
17 proteína quando aumentada na urina, provavelmente está aumentada no plasma, e a barreira
18 glomerular deve ter dano suficiente para filtração de proteínas de alta MW (SMETS et al.,
19 2010).

20 A RBP é uma proteína de transporte ligada ao retinol com MW aproximada
21 de 21 kDa. Esse complexo isoenzima-retinol se liga a transtirretina, o que previne sua
22 passagem pela filtração glomerular. Na ausência do retinol a RBP sofre uma mudança na sua
23 conformação que impede a sua ligação com a transtirretina, sendo filtrada pelo glomérulo mas
24 reabsorvida nos túbulos contorcidos proximais. Portanto, lesões tubulares de qualquer
25 natureza aumentam a excreção urinária da RBP e por consequência ocorre elevação da relação
26 RBP/creatinina urinária (PRESSLER, 2013).

27 Proteínas supracitadas são biomarcadores de lesão renal já conhecidos e
28 mais estudados na medicina humana e veterinária. Entretanto, a busca de novos
29 biomarcadores de lesão renal precoce ainda se faz necessário, já que melhoram o diagnóstico
30 e podem predizer o prognóstico da doença. O estudo da proteômica e a identificação dos
31 peptídeos pela espectrometria de massas permite identificar múltiplas proteínas em uma
32 amostra e vem sendo utilizada para um melhor entendimento da patogenia da lesão renal e na
33 identificação de novos biomarcadores tanto na medicina humana como na medicina de
34 animais de companhia (BARBOSA et al., 2012; BRANDT et al., 2014).

2.7 PROTEÔMICA URINÁRIA NA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE LESÃO RENAL PRECOCE

O sufixo “ômica” descreve uma abordagem científica que tem como objetivo estudar moléculas biológicas de classes distintas e entender suas funções e interligações. Portanto, avaliando todos os fatores envolvidos em um processo patológico específico, pode-se entender uma doença com maior precisão (SCHANSTRA; MISCHAK, 2015). O termo proteômica refere-se ao estudo de proteínas que são direta ou indiretamente responsáveis pelo controle de todos ou quase todos os processos biológicos. Na busca de marcadores moleculares tanto para o diagnóstico precoce de afecções como para um melhor entendimento da patogênese das doenças, muitos estudos tem focado os produtos protéicos envolvidos em processos celulares, assim como em alterações gênicas e seus transcritos (BARBOSA et al., 2012).

A proteômica urinária tem sido utilizada para identificar biomarcadores em potencial para o diagnóstico, prognóstico e novos alvos terapêuticos em pesquisas renais na medicina e veterinária (SU et al., 2013; BRANDT et al., 2014). Como análises proteômicas não necessitam de anticorpos, essa técnica é bem adequada para pesquisa de biomarcadores em animais, porém, na medicina veterinária poucos são os estudos disponíveis (NABITY et al., 2011).

Em cães a concentração de proteínas na urina de indivíduos clinicamente saudáveis pode variar consideravelmente com a ingestão de líquido e alimento, exercícios, sexo e idade. A urina de cães contém pequenas quantidades de proteínas de intermediária e baixa MW provenientes da ultrafiltração e incompleta reabsorção da albumina e seus componentes. Proteínas secretadas pelas células tubulares podem ser encontradas também em pequenas quantidades, sendo a uromodulina (Tamm-Horsfall protein) a mais abundante (MILLER et al., 2014).

Comparanda ao plasma e ao soro, a urina leva vantagem pois, as proteínas são abundantes no plasma e soro mas na urina são praticamente ausentes, portanto a interpretação é mais fidedigna. Em adição, as proteínas presentes na urina são particularmente estáveis, provavelmente pelo fato de permanecerem estocadas na vesícula urinária por várias horas a 37°C e nenhuma evidência de proteólise tem sido identificada (SCHANSTRA; MISCHAK, 2015).

O proteoma urinário é alterado em cães com doença renal, tanto glomerular, que aumenta a presença de proteínas de média e alta MW, como tubular, no qual são

1 observados pequenos peptídeos presentes na urina. Em humanos e cães, eletroforese de
2 proteínas urinárias tem sido descrito como um método de estudo para doenças renais e os
3 biomarcadores em cães são semelhantes aos encontrados em humanos (MILLER et al., 2014).

4 5 2.8 PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS COM POTENCIAL PARA BIOMARCADORES DE LESÃO RENAL EM 6 CADELAS COM PIOMETRA

7
8 A nefropatia hereditária ligada ao cromossomo X (XLHN) em cães leva o
9 desenvolvimento de grave proteinúria associada à doença renal progressiva e terminal nos
10 primeiros meses de vida. Por isso, cães com essa alteração foram usados como modelo
11 experimental na detecção de biomarcadores de lesão renal precoce por técnicas proteômicas,
12 da urina. Uma grande quantidade de proteínas foram identificadas como possíveis
13 biomarcadores, dentre estas a RBP, hemopexina, apolipoproteína A1, perlecan, gelsolina,
14 complemento C3, colágeno tipo XXVII, glicoproteína alfa-2-HS (fetuin A), haptoglobina,
15 molécula de adesão juncional A, imunoglobulina e precursor microglobulina/bikunina
16 (AMBP). Vale ressaltar que nesse estudo a albumina foi extraída das amostras antes da
17 análise proteômica (NABITY et al., 2011).

18 O perfil proteômico urinário de cães que sofreram acidente ofídico por
19 víbora (*Vibera berus berus*) cujo o veneno possui efeito nefrotóxico, foi realizado por
20 eletroforese bidimensional seguida de espectrometria de massas. As proteínas diferenciais nos
21 grupos, presentes nos cães que sofreram acidente ofídico e ausentes no grupo controle foram
22 antitripsina alfa-1, albumina, microglobulina beta-2, fetuina-B, superóxido dismutase
23 (PALVIAINEN et al., 2012).

24 A microglobulina beta-2 possui MW aproximada de 11,7 kDa e é
25 encontrada na superfície celular de todas as células nucleadas. Quando se destaca da
26 superfície celular circula no plasma na forma livre e seu nível sérico depende da função renal,
27 pois é filtrada pelo glomérulo e totalmente reabsorvida pelas células tubulares, sendo um bom
28 biomarcador urinário para identificar lesão renal tubular (JOHNSTON et al., 2011).

29 AMBP é processada em microglobulina alfa-1 e bikunina e o aumento da
30 excreção da microglobulina alfa-1 tem sido relacionada com lesão tubular em pessoas com
31 diversas causas de doenças renais. A gelsolina plasmática diminui com a progressão da
32 doença renal crônica e isso está associado ao aumento da mortalidade. Em adição, outras
33 proteínas abundantes no plasma, como as imunoglobulinas, haptoglobinas e apolipoproteína A
34 também foram identificadas na urina de cães com doença glomerular (NABITY et al., 2011).

1 Antitripsina alfa-1 são glicoproteínas produzidas no fígado com função
2 protetora da matrix extracelular durante a inflamação e possui efeitos protetores renais
3 durante lesão por isquemia e reperfusão, sendo considerada um biomarcador de lesão renal
4 aguda em humanos. A fetuina-B pertence a superfamília da cistatina e ambas foram
5 detectadas na urina de ratos e humanos com danos renais (PALVIAINEN et al., 2012).

6 São muitos os possíveis biomarcadores de lesão renal precoce quando se
7 utiliza técnicas de proteômica. Apesar de descobertas importantes na medicina, na veterinária
8 são poucos os estudos e quando se trata de proteômica urinária de cadelas com piometra,
9 nenhum estudo foi encontrado na literatura. Assim, estudos que busquem identificar
10 marcadores de lesão renal precoce em cadelas com piometra e que esses possam ajudar no
11 melhor entendimento da fisiopatogenia da insuficiência renal induzida por essa afecção
12 podem contribuir com a abordagem diagnóstica e terapêutica e por consequência com o
13 prognóstico dos pacientes.

14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

- 1 dopamine agonist and prostaglandin agonist treatment of cystic endometrial hyperplasia-
2 pyometra complex in the bitch. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1557–1559, 2006.
3 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.004>.
- 4 COX, H. U. Staphylococcal infections. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog**
5 **and cat**. 3 ed. Saint Louis: Saunders, 2006. p. 316-320.
- 6 DE LOOR, J.; DAMINET, S.; SMETS, P.; MADDENS, B.; MEYER, E. Urinary biomarkers
7 for acute kidney injury in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine / American**
8 **College of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 5, p. 998–1010, 2013.
9 <https://doi.org/10.1111/jvim.12155>.
- 10 ELLENPORT, C. R. Aparelho urogenital do carnívoro. In. GETTY, R. **Sisson/Grossman:**
11 **Anatomia dos Animais Domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Googan, 1986, p.
12 1489-1493.
- 13 EMANUELLI M. P.; MARTINS, D. B.; WOLKMER, P.; ANTONIAZZI, A. Q.;
14 EMANUELLI, T.; VARGAS, A. C.; DOS ANJOS LOPES, S. T. Complete blood count, total
15 plasma protein, neutrophil oxidative metabolism, and lipid peroxidation in female dogs with
16 pyometra associated with *Escherichia coli*. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, n. 3, p.
17 309–313, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-1097-z>.
- 18 FELDMAN, E. C. O complexo hiperplasia endometrial cística/piometra e infertilidade em
19 cadelas In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**.
20 5ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 1632-1649.
- 21 FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine e Feline Endocrinology and Reproduction**, 2.
22 ed. Philadelphia: Saunders, 1996, p. 547 – 571.
- 23 FIENI, F. Patologia de los ovários y el útero in: WANKE, M. M.; GOBELLO, C.
24 **Reproduccion en Caninos y Felinos Domesticos**. 1ª ed., Buenos Aires: Ed. Inter-Médica,
25 2006, p. 75-89.
- 26 FRANSSON, B. **Systemic Inflammatory Response in Canine Pyometra: The Response to**
27 **Bacterial Uterine Infection**. 2003. Doctoral Thesis (Veterinaria) Swedish University of
28 Agricultural Sciences, Uppsala, 2003.

- 1 GEBHARDT, C.; HIRSCHBERGER, J.; RAU, S.; ARNDT, G.; KRAINER, K.;
2 SCHWEIGERT, F. J.; KOHN, B. Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with
3 systemic inflammatory response syndrome or sepsis. **Journal of Veterinary Emergency and**
4 **Critical Care**, v. 19, n. 5, p. 450–458, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1476->
5 4431.2009.00462.x.
- 6 GOBELLO, C. Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH
7 agonists and anti-estrogens in canine reproduction: A review. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7,
8 p. 1560–1567, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.005>.
- 9 GRAUER, G. F. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. **Veterinary**
10 **Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 35, n. 3, p. 581–596, 2005.
11 <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2004.12.013>.
- 12 GRAUER, G. F. Proteinuria: Measurement and Interpretation. **Topics in Companion Animal**
13 **Medicine**, v. 26, n. 3, p. 121–127, 2011. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.002>.
- 14 GREENE, C. E.; PRESCOTT, J. F. Streptococcal and other Gram-positive bacterial
15 infections. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3 ed. Saint Louis:
16 Saunders, 2006. p. 302-315.
- 17 GREINER, M.; WOLF, G.; HARTMANN, K. A retrospective study of the clinical
18 presentation of 140 dogs and 39 cats with bacteraemia. **Journal of Small Animal Practice**, v.
19 49, n. 8, p. 378–383, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2008.00546.x>.
- 20 GROOTERS, A. M. Diseases of the ovaries and uterus. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING,
21 R. G. **Saunders manual of small animal practice**. Saunders1994, p. 1467.
- 22 HAGMAN, R. (). Canine pyometra: What is new? **Reproduction in Domestic Animals**, v.
23 51, n. 3, p. 1–5, 2016. <https://doi.org/10.1111/rda.12843>.
- 24 HAGMAN, R. **New aspects of canine pyometra - studies on epidemiology and**
25 **pathogenesis**. 2004. Thesis - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 2004 .
- 26 HAGMAN, R.; KINDAHL, H.; FRANSSON, B. A.; BERGSTROM, A.; HOLST, B. S.;
27 LAGERSTEDT, A. S. Differentiation between pyometra and cystic endometrial
28 hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F2 α metabolite analysis. **Theriogenology**,

- 1 v. 66, n. 2, p. 198–206, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.11.002>.
- 2 HAGMAN, R., KUHN, I. *Escherichia coli* strains isolated from the uterus and urinary bladder
3 of bitches suffering from pyometra: Comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-
4 field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, v. 84, n. 1-2, p. 143–153, 2002.
5 [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00449-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00449-7).
- 6 HEIENE, R.; KRISTIANSEN, V.; TEIGE, J.; JANSEN, J. H. Renal histomorphology in dogs
7 with pyometra and control dogs, and long term clinical outcome with respect to signs of
8 kidney disease. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 49, p. 13, 2007.
9 <https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-13>.
- 10 HEIENE, R.; MOE, L.; MOLMEN, G. Calculation of urinary enzyme excretion, with renal
11 structure and function in dogs with pyometra. **Research in Veterinary Science**, v. 70, n. 2, p.
12 129–137, 2001. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2000.0451>.
- 13 HOFFMANN, B.; RIESENBECK, A.; KLEIN, R. Reproductive endocrinology of bitches.
14 **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 275–288, 1996.
15 [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01484-4](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01484-4).
- 16 JOHNSON, J. R.; BROWN, J. J.; CARLINO, U. B.; RUSSO, T. A. Colonization with and
17 acquisition of uropathogenic *Escherichia coli* as revealed by polymerase chain reaction-based
18 detection. **Journal Infection Disease**, v.177, p. 1120-1124, 1998.
- 19 JOHNSTON, O.; CASSIDY, H.; O'CONNELL, S.; O'RIORDAN, A.; GALLAGHER, W.;
20 MAGUIRE, P. B.; MCMORRAOW, T. Identification of α -2-microglobulin as a urinary
21 biomarker for chronic allograft nephropathy using proteomic methods. **Proteomics - Clinical**
22 **Applications**, v. 5, n. 7-8, p. 422–431, 2011. <https://doi.org/10.1002/prca.201000160>.
- 23 JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. **Canine and feline**
24 **theriogenology**. Philadelphia : Saunders, 2001. p.19-104.
- 25 KUPLULU, S.; VURAL, M. R.; DEMIREL, A.; POLAT, M.; AKÇAY, A. The comparative
26 evaluation of serum biochemical, haematological, bacteriological and clinical findings of dead
27 and recovered bitches with pyometra in the postoperative process. **Acta Veterinaria**, v. 59, n.
28 2-3, p. 193–204, 2009. <https://doi.org/10.2298/AVB0903193K>.

- 1 LI, R. H. L.; CHAN, D. L. Evaluation of platelet function using multiple electrode platelet
2 aggregometry in dogs with septic peritonitis. **Journal of Veterinary Emergency and**
3 **Critical Care**, v. 26, n. 5, p. 630–638, 2016. <https://doi.org/10.1111/vec.12508>.
- 4 MADDENS, B.; DAMINET, S.; SMETS, P.; MEYER, E. Escherichia coli Pyometra Induces
5 Transient Glomerular and Tubular Dysfunction in Dogs. **Journal of Veterinary Internal**
6 **Medicine**, v. 24, n. 6, p. 1263–1270, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0603.x>.
- 7 MADDENS, B.; HEIENE, R.; SMETS, P.; SVENSSON, M.; ARESU, L.; VAN DER LUGT,
8 J.; MEYER, E. Evaluation of Kidney Injury in Dogs with Pyometra Based on Proteinuria,
9 Renal Histomorphology, and Urinary Biomarkers. **Journal of Veterinary Internal**
10 **Medicine**, v. 25, n. 5, p. 1075–1083, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0772.x>.
- 11 MILLER, I.; PREBLMAYER-HARTLER, A.; WAIT, R.; HUMMEL, K.; SENSI, C.;
12 EBERINI, I.; GIANAZZA, E. In between - Proteomics of dog biological fluids. **Journal of**
13 **Proteomics**, v. 106, p. 30–45, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.016>.
- 14 NABITY, M. B.; LEES, G. E.; DANGOTT, L. J.; CIANCIOLO, R.; SUCHODOLSKI, J. S.;
15 STEINER, J. M. Proteomic analysis of urine from male dogs during early stages of
16 tubulointerstitial injury in a canine model of progressive glomerular disease. **Veterinary**
17 **Clinical Pathology**, v. 40, n. 2, p. 222–236, 2011. [https://doi.org/10.1111/j.1939-](https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00307.x)
18 [165X.2011.00307.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00307.x).
- 19 OLIVEIRA, C. A.; DE MARTIN, C. M.; SILVA, A. S.; OLIVEIRA, C. M.; GIORGI, W.;
20 DE MARTIN, B. W.; Prevalência de agentes microbianos envolvidos na piometra canina.
21 **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da**
22 **Universidade de São Paulo**, v.12, n.2, p. 184, 1988.
- 23 PALVIAINEN, M.; RAEKALLIO, M.; VAINIONPAA, M.; KOSONEN, S.; VAINIO, O.
24 Proteomic profiling of dog urine after European adder (*Vipera berus berus*) envenomation by
25 two-dimensional difference gel electrophoresis. **Toxicon**, v. 60, n. 7, p. 1228–1234, 2012.
26 <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.08.010>.
- 27 PRESSLER, B. M. Clinical Approach to Advanced Renal Function Testing in Dogs and Cats.
28 **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 43, n. 6, p. 1193–1208,
29 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2013.07.011>.

- 1 PRETZER, S. D. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review.
2 **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 359–363, 2008.
3 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.028>.
- 4 QUINN, P. J.; MARKEY, B.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C.
5 **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre. Ed. Artmed, 2005. p.115-
6 130.
- 7 ROOT KUSTRITZ, M. V. Managing the Reproductive Cycle in the Bitch. **Veterinary**
8 **Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 42, n. 3, p. 423–437, 2012.
9 <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.01.012>.
- 10 SANT' ANNA, M. C.; GIORDANO, L. G. P.; FLAIBAN, K. K. M. C.; MULLER, E. E.;
11 MARTINS, M. I. M. Prognostic markers of canine pyometra. **Arquivo Brasileiro de**
12 **Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1711–1717, 2014.
13 <https://doi.org/10.1590/1678-6859>.
- 14 SCHANSTRA, J. P.; MISCHAK, H. Proteomic urinary biomarker approach in renal disease:
15 from discovery to implementation. **Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)**, v. 30, n. 5, p.
16 713–725, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00467-014-2790-y>.
- 17 SMETS, P. M. Y.; MEYER, E.; MADDENS, B. E. J.; DUCHATEAU, L.; DAMINET, S.
18 Urinary markers in healthy young and aged dogs and dogs with chronic kidney disease.
19 **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 1, p. 65–72, 2010.
20 <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0426.x>.
- 21 SPECHT, A.; CHAN, D.; O'TOOLE, T.; KENT, M.; BENSON, J. A.; ROZANSKI, E.;
22 RUSH, J. Acute staphylococcal peritonitis following cystocentesis in a dog. **Journal of**
23 **Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 12, n. 3, p. 183–187, 2002.
24 <https://doi.org/10.1046/j.1435-6935.2002.00037.x>.
- 25 SU, L.; CAO, L.; ZHOU, R.; JIANG, Z.; XIAO, K.; Kong, W.; XIE, L. Identification of
26 Novel Biomarkers for Sepsis Prognosis via Urinary Proteomic Analysis Using iTRAQ
27 Labeling and 2D-LC-MS/MS. **Plos one**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2013.
28 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054237>.
- 29 SUN, D.; RAISLEY, B.; LANGER, M.; IYER, J. K.; VEDHAM, V.; BALLARD, J. L.;

- 1 COGGESHALL, K. M. Anti-Peptidoglycan Antibodies and Fc Receptors Are the Key
2 Mediators of Inflammation in Gram-Positive Sepsis. **The Journal of Immunology**, v. 189, n.
3 5, p. 2423–2431, 2012. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201302>.
- 4 VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, G.; VERTEGEN-ONCLIN, K. Mucometra, cystic
5 endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: Advances in treatment and assessment of
6 future reproductive success. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 364–374, 2008.
7 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.036>.
- 8 WEISS, R. R.; CALOMENO, M. A.; SOUSA, R. S.; BRIERSDORF, S. M.; CALOMENO,
9 R. A.; MURADÁS, P. Avaliação Histológica, Hormonal e Bacteriológica da Piometra na
10 cadela. **Archives of Veterinary Science**, v.9, n.2, p. 81-87, 2004.
- 11 ZARAGOZA, C.; BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J. A.; MANE, M. C. Canine
12 pyometra: A study of the urinary proteins by SDS-PAGE and Western blot. **Theriogenology**,
13 v. 61, n. 7-8, p. 1259–1272, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.07.019>.
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25

1 3. HIPÓTESE

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

A lesão renal inicial em cadelas com piometra é devido ao comprometimento da função tubular e a relação proteína/creatinina urinária e proteínas urinárias de baixa massa molecular podem ser utilizadas como marcadores de lesão renal precoce em cadela com piometra.

1 **4. OBJETIVO**

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

Avaliar o uso da relação proteína/creatinina urinária para a identificação de lesão renal antes do desenvolvimento da azotemia e identificar proteínas urinárias presentes em cadelas com piometra com potencial para serem utilizadas como biomarcadores de lesão renal precoce.

5. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

ARTIGO 1

Uso da Relação Proteína/Creatinina Urinária no Diagnóstico Precoce da Lesão Renal em Cadelas com Piometra

Protein-to-Creatinine Urinary in the Early Diagnosis of Renal Injury in Canine Pyometra

Resumo: A doença renal que acomete cadelas com piometra pode levar a paciente a desenvolver insuficiência renal crônica mesmo após o tratamento. Em vista disso, vários estudos buscam esclarecer as lacunas para o entendimento da patogenia da lesão renal na piometra e a identificação de marcadores para detecção precoce da lesão renal que podem prever e identificar o prognóstico da doença. A análise da proteinúria pode diagnosticar lesão renal, já que proteínas como a albumina não são filtradas pelo glomérulo e as que passam pela filtração glomerular são quase totalmente reabsorvidas pelas células tubulares. O objetivo desse estudo foi avaliar se a relação proteína/creatinina urinária (UPC) pode detectar lesão renal em cadelas com piometra antes do desenvolvimento da azotemia. Para isso, 44 cadelas com piometra foram divididas em dois grupos. Cadelas com piometra azotêmicas (A, n = 15, creatinina > 1,7) e cadelas com piometra não azotêmicas (NA, n = 29). Os dois grupos foram comparados ao grupo controle (GC, n = 12) sem sinais de doenças sistêmicas. Todos os animais foram submetidos a exame de sangue e urina. A leucocitose foi mais evidente nas cadelas do grupo A do que nos demais grupos, o que evidencia que a resposta inflamatória pode estar associada ao agravamento da lesão renal. A mediana da UPC nas cadelas com piometra foi maior do que no GC e acima dos valores de referência. Baseado nos resultados obtidos pode-se concluir que a UPC pode ser utilizada em cadelas com piometra para detectar lesão renal antes do desenvolvimento da azotemia, sendo sugerido que cadelas que tiveram piometra sejam acompanhadas por meio da UPC durante o período pós-operatório para que possam ser diagnosticadas lesões renais permanentes, possibilitando o tratamento adequado antes do desenvolvimento da azotemia.

Palavras chave: UPC, Hiperplasia endometrial cística, Insuficiência renal, Proteinúria.

1 **Abstract:** Kidney disease that affects bitches with pyometra may lead the patient to develop
2 chronic renal failure even after pyometra treatment. Therefore, several studies have sought to
3 clarify the gaps in the understanding of the pathogenesis of renal injury in pyometra.
4 Identification of early detection markers for renal damage, which can predict and identify the
5 prognosis of disease. Proteinuria analysis can diagnose kidney damage, since proteins such as
6 albumin are not filtered through the glomerulus and those that undergo glomerular filtration
7 are almost completely reabsorbed by tubular cells. The objective of this study was to evaluate
8 whether urinary protein-to-creatinine ratio (UPC) can detect renal injury in bitches with
9 pyometra before development of azotemia. For this, 44 bitches with pyometra were divided
10 into two groups. Bitches with pyometra azotemics (A, n = 15, creatinine > 1.7) and bitches
11 with pyometra non-azotemic (NA, n = 29). The two groups were compared to the control
12 group (CG, n = 12) with no signs of systemic diseases. All animals underwent blood and urine
13 tests. Leukocytosis was more evident in bitches in the PA group than in the other groups. This
14 shows that inflammatory response may be associated with pathogenesis of renal injury. The
15 median of UPC in bitches with pyometra were significantly higher than in the CG and with a
16 median above the reference values. In conclusion, the UPC can be used in bitches with
17 pyometra to detect renal damage before the development of azotemia. It has been suggested
18 that bitches with pyometra should be followed through the UPC during the postoperative
19 period so that they can be diagnosed permanent renal lesions secondary to pyometra and thus
20 be treated properly before the development of azotemia.

21 .
22 **Key words:** UPC, Cystic endometrial hyperplasia, renal injury, Proteinuria.

1 **Introdução**

2

3 A piometra canina acomete principalmente cadelas adultas e idosas durante
4 o diestro, após a contaminação uterina por bactérias da microbiota vaginal durante o estro.
5 Neste período do ciclo estral as bactérias encontram ambiente uterino favorável, acometido
6 pela hiperplasia endometrial cística (HAGMAN, 2004; PRETZER, 2008; VERSTEGEN et
7 al., 2008). A *Escherichia coli* é a bactéria Gram-negativa isolada com maior frequência, já
8 que possui fatores de virulência que facilitam sua aderência no endométrio que está sob
9 influência da progesterona (HAGMAN; KUHN, 2002; BASSESSAR et al., 2013; HAGMAN,
10 2016).

11 A lesão renal é comum em cadelas com piometra, porém ainda não está
12 totalmente elucidada. A teoria que a glomerulonefrite secundária a deposição de
13 imunocomplexos que se formam em decorrência da resposta inflamatória, desencadeada pelo
14 excesso de antígenos da *E. coli*, foi aceita por muito tempo (JOHNSTON et al., 2001; FIENI,
15 2006). Entretanto, com o desenvolvimento de novos marcadores de lesão renal, que possuem
16 capacidade de identificar o compartimento renal acometido, a patogenia tem sido contestada,
17 e o mais aceito na última década é a lesão renal glomerular e tubular, mas sem evidências de
18 glomerulonefrite propriamente dita (HEIENE et al., 2007; MADDENS et al., 2010, 2011).

19 A insuficiência renal desenvolvida durante a piometra é um dos principais
20 fatores prognósticos da afecção (KUPLULU, et al., 2009; SANT' ANNA et al., 2014).
21 Portanto, a busca de marcadores de lesão renal precoce que possam prever a evolução da
22 doença se faz necessária, já que a creatinina sérica, que possui baixa sensibilidade, ainda é o
23 marcador mais usado na rotina clínica para detectar a alteração em cadelas com piometra (DE
24 LOOR et al., 2013; PRESSLER, 2013).

25 Nesse contexto, sendo a urina de fácil coleta, contendo pequenas
26 quantidades de proteínas, e a proteinúria persistente estar relacionada com pior prognóstico
27 em paciente com doença renal crônica (GRAUER, 2005, 2011), o estudo da proteinúria
28 durante o desenvolvimento da piometra e a comparação de pacientes com diferentes níveis de
29 lesão renal pode trazer informações importantes sobre a evolução da doença, já que, uma
30 parcela de pacientes permanece com proteinúria mesmo após a recuperação clínica, tendo alto
31 risco no desenvolvimento de insuficiência renal crônica.

32 O objetivo desse estudo foi avaliar se a relação proteína/creatinina urinária
33 (UPC) pode detectar lesão renal em cadelas com piometra antes do desenvolvimento da
34 azotemia.

1 **Material e Métodos**

2
3 Todos os procedimentos desse estudo foram submetidos e aprovados pelo
4 Comitê de Ética e Experimentação Animal Institucional, sob o número do processo do CEUA
5 28539201365.

6 7 *Animais*

8
9 Participaram do estudo 44 cadelas com piometra e 12 cadelas sem
10 sintomatologia sistêmica (controle). Nenhuma raça foi expressada. As cadelas com piometra
11 receberam tratamento clínico de suporte e cirúrgico conforme a rotina clínica adotada para o
12 tratamento.

13 O diagnóstico da infecção foi baseado no histórico, exame clínico, exames
14 hematológicos e por ultrassonografia abdominal, realizados na admissão das pacientes e
15 confirmado durante o procedimento cirúrgico.

16 O critério de inclusão para o grupo piometra foi o diagnóstico baseado nos
17 exames utilizados; o de exclusão foi a suspeita ou confirmação de qualquer doença
18 concomitante.

19 Os critérios de inclusão para o grupo controle foram cadelas, não castradas,
20 adultas ou idosas, que procuraram o atendimento hospitalar para cirurgias como
21 ovariectomia (OH) eletiva, mastectomia unilateral devido a neoplasia mamária única
22 (menor que 3 cm) e tratamento periodontal. Os critérios de exclusão desse grupo se deram
23 quando qualquer anormalidade clínica sistêmica foi identificada durante anamnese, exame
24 físico geral, hemograma e bioquímica plasmática (creatinina, alanina aminotransferase e
25 glicose) realizados na admissão das pacientes.

26 As cadelas com piometra foram distribuídas em dois grupos baseado nos
27 níveis da creatinina plasmática, sendo consideradas azotêmicas quando a creatinina foi
28 superior a 1,7 mg/dL. O grupo de piometra não azotêmica (NA) foi composto por 29 cadelas e
29 o piometra azotêmica (A) por 15 animais. Um terceiro grupo foi formado pelas 12 cadelas do
30 grupo controle (GC).

31 A idade média das cadelas com NA foi de $8,0 \pm 4,0$ anos, as com A de $10,0$
32 $\pm 3,0$ anos e do grupo controle (GC) de $9,5 \pm 3,0$ anos. O peso médio do grupo NA foi de
33 16,0Kg, do grupo A de 14,5Kg e do GC 11,0Kg. Tanto a idade como o peso não foram
34 significativamente diferentes entre os grupos.

1 Todas as pacientes passaram por coleta de sangue por punção da veia
2 jugular externa na admissão. A amostra foi depositada em tubo contendo EDTA e
3 encaminhada para exames laboratoriais (hemograma completo e dosagem de creatinina,
4 alanino aminotransferase e glicose). O resultado do hemograma foi usado na tabulação dos
5 dados e os resultados bioquímicos para os critérios de inclusão e exclusão dos animais.
6 Posteriormente, todos os animais passaram por nova coleta de sangue após indução anestésica
7 com propofol. Essa amostra foi utilizada para obtenção do soro, após a centrifugação por 5
8 minutos a 1.500g. O sobrenadante resultante foi armazenado a -20°C para avaliação da
9 bioquímica sérica.

10 A coleta de urina foi por cistocentese trans-cirúrgica para cadelas com
11 piometra ou cadelas do GC que passaram por OHE. A cistocentese guiada por ultrassom foi
12 utilizada nas demais cadelas do GC. As amostras de urina foram destinadas a urinálise e após
13 centrifugação por 5 minutos a 1.500 g, o sobrenadante armazenado a -20°C, o qual foi
14 utilizada para dosagem de proteína e creatinina urinária.

15 A UPC foi realizada somente nas amostras de urina sem sedimento. Como
16 critério de exclusão, amostras com mais que cinco leucócitos e/ou hemácias por campo na
17 análise do sedimento urinário não foram incluídas na avaliação da UPC. A densidade urinária
18 não foi avaliada nesse estudo, uma vez que, cadelas com piometra recebiam fluidoterapia
19 antes do procedimento cirúrgico.

21 *Hematologia, exames bioquímico, urinálise e UPC*

22
23 O volume globular, a hemoglobina, a contagem total de hemácias e a
24 contagem de leucócitos totais foram realizadas em analisador hematológico automatizado. A
25 contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço sanguíneo com coloração tipo
26 Romanowsky (Panótipo rápido, Laborclin®, Pinhais, Brasil) juntamente com a estimativa de
27 plaquetas, que foi obtida por média em cinco campos observados.

28 A determinação da alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA),
29 uréia, creatinina e creatinina urinária foram realizadas pelo método cinético. A dosagem de
30 proteínas totais pelo método do biureto, proteína urinária pelo método colorimétrico vermelho
31 de pirolagol e a albumina pelo método colorimétrico, todos com leitura em espectrofotômetro
32 (BS-120 Mindray®, China). A UPC foi calculada pela divisão da proteína urinária pela
33 creatinina urinária (THRALL, 2007).

1 A urinálise foi realizada para avaliação do sedimento urinário, esse foi
2 obtido após centrifugação durante 5 minutos a 1.500 g e visualização do sedimento em
3 microscopia em câmara de Neubauer. As hemácias, leucócitos e bactérias foram expressadas
4 em número por campo.

6 *Análise estatística*

8 As variáveis foram analisadas utilizando o programa estatístico Bioestat 5.0.
9 Variáveis foram testadas para distribuição pelo teste de Shapiro Wilk. O ANOVA seguido
10 pelo teste de Tukey comparou as variáveis com distribuição normal (hemácias, hematócrito e
11 hemoglobina). Variáveis que não apresentaram distribuição normal (albumina, proteínas
12 totais, ALT, FA, ureia, creatinina, proteína urinária, creatinina urinária e UPC) foram
13 comparadas pelo teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Dunn. O nível de significância
14 utilizado foi $p \leq 0,05$.

16 **Resultados e Discussão**

18 Parâmetros hematológicos foram diferentes entre os grupos de cadelas com
19 piometra e o GC. Dentre as variáveis hematológicas da série vermelha, o número de
20 hemácias, o nível de hemoglobina e o volume globular foram menores nos grupos NA e A em
21 relação ao grupo controle, mas não houve diferença entre os grupos NA e A (Tabela 1).
22 Estudos que compararam parâmetros do eritrograma entre cadelas com piometra e cadelas
23 sadias também encontraram achados semelhantes (HAGMAN et al., 2006; EMANUELLI et
24 al., 2012). Cadelas com piometra desenvolveram anemia discreta a moderada, uma vez que, a
25 média do volume globular dos grupos NA e A foram menores do que as cadelas do GC e
26 inferiores aos valores de referência (Tabela 1). A anemia na piometra canina é decorrente da
27 endotoxemia e sepse secundária a infecção uterina que promove diminuição da sobrevivência das
28 hemácias e menor resposta da medula óssea a eritropoetina, sendo normalmente classificada
29 como anemia moderada, arregenerativa, normocítica e normocrômica (PRETZER, 2008;
30 VERSTEGEN et al., 2008).

31 A mediana de leucócitos totais, segmentados e bastonetes foram
32 significativamente maiores nas cadelas com piometra em relação ao GC (Tabela 1). A
33 leucocitose na piometra é caracterizada por um importante desvio regenerativo marcado pela
34 presença de bastonetes na circulação em resposta a infecção, embora em casos graves e/ou

1 crônicos pode-se observar leucopenia com desvio degenerativo, indicando depleção da
2 medula óssea (EMANUELLI et al., 2012; HAGMAN, 2016). Além disso, a mediana de
3 leucócitos totais e segmentados do grupo A foi maior que no grupo NA (Tabela 1). A doença
4 renal aguda pode ser ocasionada devido ao decréscimo da perfusão tecidual associado ao
5 choque séptico, e processos isquêmicos usualmente levam à lesão renal tubular, por essa parte
6 do néfron ser mais ativa metabolicamente (GRAUER, 2005). Portanto, a associação de
7 leucocitose mais grave em pacientes azotêmicos encontrada nesse estudo, pode indicar, que a
8 hipoperfusão renal secundária a sepse é um importante mecanismo de agravamento da lesão
9 renal em cadelas com piometra.

10 O número de linfócitos e plaquetas não foi diferente entre os grupos (Tabela
11 1), apesar disso a mediana do número de plaquetas do grupo A foi inferior ao valor de
12 referência normal para a espécie canina (THRALL, 2007). Cães com sepse podem
13 desenvolver trombocitopenia devido a formação de agregados plaquetários secundário a ação
14 de lipopolissacarídeos e a interação com neutrófilos (LI; CHAN, 2016); justificando os
15 achados.

16 Dentre os parâmetros bioquímicos, a albumina sérica foi significativamente
17 menor nas cadelas com piometra do que no GC, mas não houve diferença entre os grupos NA
18 e A (Tabela 2). A hipoalbuminemia em cadelas em condição inflamatória de origem
19 infecciosa, principalmente por bactérias gram-negativas pode ocorrer secundária a diminuição
20 da produção hepática e/ou aumento da permeabilidade vascular, ambos devido a liberação de
21 endotoxinas (GREINER; WOLF; HARTMANN, 2008).

22 A diferença encontrada nos valores de creatinina e uréia entre os grupos NA
23 e A foi esperado, pois os grupos foram formados baseados nos valores da creatinina (Tabela
24 2) sendo esse o diferencial desse estudo, com um número significativo de cadelas com
25 piometra não azotêmicas e azotêmicas, permitindo assim, a avaliação da UPC como marcador
26 de lesão renal precoce em cadelas com piometra, visto que, a insuficiência renal na piometra é
27 um dos fatores prognósticos mais importantes na evolução da doença (SANT ANNA et al.,
28 2014).

29

30

31

32

1 Tabela 1. Variáveis do eritrograma, expressadas em média e desvio padrão e leucocitárias,
 2 expressadas em mediana, mínimo e máxima e comparadas entre os grupos cadelas com
 3 piometra não azotêmicas, piometra azotêmicas e controle.

Parâmetros hematológicos	Não azotêmicas (n = 29)	Azotêmicas (n = 15)	Controle (n = 12)
Hemácias (x10⁶)	5,05 (±1,90) ^A	5,45 (±1,50) ^A	7,27 (±1,09) ^B
Hemoglobina (g/dl)	10,7± 4,2 ^A	11,6± 3,1 ^A	16,1± 2,1 ^B
Volume globular (%)	33,8± 8,2 ^A	33,4± 9,0 ^A	47,1± 5,9 ^B
Leucócitos totais (m/mm³)	26.400 ^A (9.100 – 75.600)	43.500 ^B (18.700-101.300)	8.650 ^C (5.500-16.660)
Segmentados (m/mm³)	18.427 ^A (3.549-70.560)	35.002 ^B (10.285-75.975)	6.142 ^C (3.294-13.446)
Bastonetes (m/mm³)	760 ^A (0 – 11.022)	1.347 ^A (0 – 15.195)	0 ^B (0 – 282)
Linfócitos (m/mm³)	2.526 (1.088-7.384)	2.694 (959-9.117)	1.494 (880-2.852)
Plaquetas (m/mm³)	225.000 (28.000-990.000)	166.000 (39.000-897.000)	250.000 (102.000-382.000)

4 *Letras diferentes entre as colunas demonstram diferença significativa.

5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

A lesão renal causada durante a piometra canina foi por muito tempo creditada à formação de imunocomplexos na circulação e posterior deposição na membrana basal do glomérulo causando glomerulonefrite (JOHNSTON al., 2001; FIENI, 2006). Entretanto, esse conceito vem sendo melhor estudado. Estudos tem encontrado, tanto por análise histopatológica de biópsias renais como por uso de biomarcadores de lesão renal, que o compartimento renal mais acometido em cadelas com piometra são as células tubulares, e que as alterações glomerulares são semelhantes com as encontradas em cadelas sadias da mesma faixa etária (HEIENE et al., 2001; ZARAGOZA et al., 2004; HEIENE et al., 2007; MADDENS et al., 2010).

1 Tabela 2. Variáveis bioquímicas expressadas em mediana mínimo e máxima e comparadas
 2 entre os grupos de cadelas com piometra não azotêmicas, azotêmicas e grupo controle.

Parâmetros bioquímicos	Não azotêmicas (n = 29)	Azotêmicas (n = 15)	Controle (n = 12)
Albumina (g/dl)	1,6 ^A (1,2 – 3,7)	1,7 ^A (1,0 – 2,7)	2,2 ^B (1,3 – 2,7)
Proteínas totais (g/dl)	6,3 (4,4 – 10,5)	6,3 (3,6 – 9,7)	5,4 (3,6 – 6,8)
FA (U/L)	81 (36 – 1.173)	142 (30 – 942)	33,5 (22 – 500)
ALT (U/L)	11 ^A (4 – 95)	7 ^A (2 – 316)	32,5 ^B (16 – 168)
Creatinina (mg/dl)	0,9 ^A (0,5 – 1,5)	3,3 ^B (1,5 – 11,1)	0,7 ^A (0,3 – 1,6)
Ureia (mg/dl)	27 ^A (19 – 59)	115 ^B (53 – 445)	40 ^C (25 – 96)

3 *Letras diferentes entre as colunas demonstram diferença significativa.

4

5 A dosagem de creatinina sérica e a urinálise são os métodos utilizados na
 6 prática clínica para detectar e avaliar a extensão da lesão renal. Entretanto, o aumento sérico
 7 da creatinina e a inabilidade renal em concentrar a urina só acontece após grave
 8 comprometimento renal. Além de serem métodos pouco sensíveis, não diferenciam dano renal
 9 tubular e glomerular (PRESSER, 2013). Por outro lado, a proteinúria pode indicar lesão renal
 10 antes do desenvolvimento da azotemia em cães com doença renal crônica e serve como
 11 indicador para determinar a gravidade da doença renal, o que pode ser determinado pela UPC
 12 (GRAUER, 2005). Nesse estudo, a concentração da creatinina urinária foi significativamente
 13 maior no grupo controle do que no grupo NA, mas não houve diferença entre os grupos NA e
 14 A. Por outro lado, a concentração da proteína urinária do grupo A foi maior que no grupo NA
 15 e no GC (Tabela 3). Tais resultados demonstraram que a proteinúria em cadelas com piometra
 16 e insuficiência renal é mais evidente, e reflete a gravidade da lesão renal no grupo A. A
 17 proteinúria renal pode ser desencadeada pelo aumento da filtração glomerular de proteínas
 18 plasmáticas associada a hipertensão intraglomerular, a presença de imunocomplexos,
 19 inflamação vascular nos capilares glomerulares ou defeito estrutural na membrana basal do

1 glomérulo. Além disso, a proteinúria pode ter origem tubular, tendo como causa a diminuição
2 da reabsorção tubular do filtrado plasmático (DE LOOR et al., 2013).

3 Na maioria das vezes, cães são considerados proteinúricos quando UPC >
4 0,5. A UPC de 0,5 a 1 geralmente são associadas a proteinúria de origem tubular e UPC > 1
5 proteinúria glomerular (GRAUER, 2011; DE LOOR et al., 2013).

6 A mediana da UPC no grupo controle foi de 0,23 variando de 0,14 a 0,49,
7 portanto, com todos os pacientes apresentando UPC dentro dos valores de referência (Tabela
8 3). O grupo NA apresentou mediana da UPC de 0,95 com intervalo que variou de 0,02 a 5,53.
9 Nesse grupo, 8/21 (38,1%) apresentaram UPC < 0,5, 4/21 (19%) tiveram UPC entre 0,5 e 1 e
10 9/21 (42,8%) apresentaram UPC > 1. Esses resultados demonstram que boa parte das cadelas
11 sem insuficiência renal apresentam UPC elevado e desses a maioria é sugestiva de lesão
12 glomerular (42,8%) e 19% é sugestiva de lesão tubular. Entretanto, 38,1% não são
13 consideradas proteinúricas quando avaliamos a UPC. Isso demonstra a necessidade do uso de
14 marcadores de lesão renal mais sensível que a UPC para tais pacientes, prevenindo resultados
15 falso negativos.

16 No grupo A a mediana da UPC foi de 1,67 e variou de 0,52 a 3,02. Nesse
17 grupo nenhuma das cadelas apresentou UPC < 0,5, 2/6 (33,3%) apresentaram UPC entre 0,5 e
18 1 e 4/6 (66,6%) tiveram UPC > 1. Tais resultados demonstram que quando azotêmicas,
19 cadelas com piometra apresentam proteinúria mais evidente e também de origem glomerular.
20 Entretanto, a UPC não é sensível na detecção da origem da lesão renal, já que, este teste
21 detecta de forma mais sensível a albumina, uma proteína de massa molecular intermediária
22 que não deveria ser filtrada pelo glomérulo, e quando presente na urina indica lesão
23 glomerular (GRAUER, 2011). Sendo assim, a UPC não identifica de forma sensível proteínas
24 de origem tubular, que poderiam estar presentes na urina antes mesmo da elevação da UPC
25 (HEIENE et al., 2001; ZARAGOZA, et al., 2004; HEIENE et al., 2007; Maddens et al.,
26 2010).

27 A maioria das cadelas com piometra de ambos os grupos (NA e A)
28 apresentaram UPC acima dos valores de referência para espécie e significativamente superior
29 ao GC, portanto, a UPC pode ser usada para detectar lesão renal precoce em cadelas com
30 piometra. Como a UPC é um método acessível, de baixo custo e rápido, deve ser usado na
31 rotina clínica tanto para diagnóstico de lesão renal precoce em cadelas com piometra como no
32 acompanhamento após a recuperação clínica do quadro infeccioso, pois parte das cadelas
33 podem se tornar proteinúricas e com maiores chances de desenvolver insuficiência renal
34 crônica se não tratadas corretamente. Maddens et al. (2011) estudaram alguns marcadores de

1 lesão renal precoce em cadelas com piometra, dentre eles a UPC, e embora também tenham
 2 encontrado diferença significativa entre o grupo piometra e controle, o grupo piometra não foi
 3 separado em cadelas azotêmicas e não azotêmicas, não sendo possível avaliar se a UPC
 4 poderia detectar lesão renal antes do desenvolvimento da azotemia.

5
 6 Tabela 3. Parâmetros urinários, expressados em mediana mínimo e máximo e comparadas
 7 entre os grupos de cadelas com piometra não azotêmicas, azotêmicas e grupo controle.

Parâmetros urinários	Não azotêmicas (n = 21)	Azotêmicas (n = 6)	Controle (n = 11)
Creatinina	42,5 ^A	85 ^{AB}	145 ^B
urinária mg/dl	(7,5 – 175)	(27,5 – 217,5)	(40 – 345)
Proteína	34,4 ^A	114,4 ^B	38,3 ^A
urinária mg/dl	(1,2 – 167,2)	(79,4 – 252,3)	(10,4–97,6)
UPC	0,95 ^A	1,67 ^A	0,23 ^B
	(0,02 – 5,53)	(0,52 – 3,02)	(0,14 – 0,49)

8 *Letras diferentes entre as colunas demonstram diferença significativa.

9

10

11 **Conclusão**

12

13 A UPC pode ser utilizada em cadelas com piometra para detectar lesão renal
 14 antes do desenvolvimento da azotemia. Ademais, sugerimos que cadelas que tiveram piometra
 15 sejam acompanhadas pela urinálise e UPC durante o período pós-operatório, visando o
 16 diagnóstico de lesões renais permanentes, secundárias a infecção, e assim, serem tratadas
 17 adequadamente antes do desenvolvimento da azotemia, aumentando a sobrevida e a qualidade
 18 de vida das pacientes.

19

20

21

22

23

24

25

26

1 **Referências**

- 2
- 3 BARBOSA, E. B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G. M.; HENRIQUE, T.; MARQUI, A. B.
4 T.; TAJARA, E. H. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas.
5 **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366–375, 2012.
6 <https://doi.org/10.1590/S0104-42302012000300019>.
- 7 BASSESSAR, V.; VERMA, Y.; SWAMY, M. Antibiogram of bacterial species isolated from
8 canine pyometra. **Veterinary World**, v. 6, n. 8, p. 546–549, 2013.
9 <https://doi.org/10.5455/vetworld.2013.546-549>.
- 10 BATISTA, P. R.; BLANCO, P. G.; GOBELLO, C. Treatment of canine pyometra with the
11 gonadotropin-releasing hormone antagonist acyline: A case series. **Topics in Companion**
12 **Animal Medicine**, v. 30, n. 1, p. 25-27, 2015. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2015.01.005>.
- 13 BATISTA, P. R.; GOBELLO, C.; RUBE, A.; CORRADA, Y. A.; TÓRTORA, M.; BLANCO
14 P. G. Uterine blood flow evaluation in bitches suffering from cystic endometrial hyperplasia
15 (CEH) and CEH-pyometra complex. **Theriogenology**, v. 85, n. 7, p. 1258–1261, 2016.
16 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.008>.
- 17 BRANDT, L. E.; EHRHART, E. J.; SCHERMAN, H.; OLVER, C. S.; BOHN, A. A.;
18 PRENNI, J. E. Characterization of the canine urinary proteome. **Veterinary Clinical**
19 **Pathology**, v. 43, n. 2, p. 193–205, 2014. <https://doi.org/10.1111/vcp.12147>.
- 20 CONCANNON, P. W. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Animal Reproduction**
21 **Science**, v. 124, n. 3-4, p. 200–210, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.028>.
- 22 CORRADA, Y.; ARIAS, D.; RODRÍGUEZ, R.; TÓRTORA, M.; Gobello, C. Combination
23 dopamine agonist and prostaglandin agonist treatment of cystic endometrial hyperplasia-
24 pyometra complex in the bitch. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1557–1559, 2006.
25 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.004>.
- 26 DE LOOR, J.; DAMINET, S.; SMETS, P.; MADDENS, B.; MEYER, E. Urinary biomarkers
27 for acute kidney injury in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 5, p.
28 998–1010, 2013. <https://doi.org/10.1111/jvim.12155>.

- 1 EMANUELLI M. P.; MARTINS, D. B.; WOLKMER, P.; ANTONIAZZI, A. Q.;
2 EMANUELLI, T.; VARGAS, A. C.; DOS ANJOS LOPES, S. T. Complete blood count, total
3 plasma protein, neutrophil oxidative metabolism, and lipid peroxidation in female dogs with
4 pyometra associated with *Escherichia coli*. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, n. 3, p.
5 309–313, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-1097-z>.
- 6 FIENI, F. Patologia de los ovários y el útero in: WANKE, M. M.; GOBELLO, C.
7 **Reproduccion en Caninos y Felinos Domesticos**. 1ª ed., Buenos Aires: Ed. Inter-Médica,
8 2006, p. 75-89.
- 9 GEBHARDT, C.; HIRSCHBERGER, J.; RAU, S.; ARNDT, G.; KRAINER, K.;
10 SCHWEIGERT, F. J.; KOHN, B. Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with
11 systemic inflammatory response syndrome or sepsis. **Journal of Veterinary Emergency and**
12 **Critical Care**, v. 19, n. 5, p. 450–458, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1476->
13 [4431.2009.00462.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2009.00462.x).
- 14 GOBELLO, C. Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH
15 agonists and anti-estrogens in canine reproduction: A review. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7,
16 p. 1560–1567, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.005>.
- 17 GRAUER, G. F. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. **Veterinary**
18 **Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 35, n. 3, p. 581–596, 2005.
19 <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2004.12.013>.
- 20 GRAUER, G. F. Proteinuria: Measurement and Interpretation. **Topics in Companion Animal**
21 **Medicine**, v. 26, n. 3, p. 121–127, 2011. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.002>.
- 22 GREINER, M.; WOLF, G.; HARTMANN, K. A retrospective study of the clinical
23 presentation of 140 dogs and 39 cats with bacteraemia. **Journal of Small Animal Practice**, v.
24 49, n. 8, p. 378–383, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2008.00546.x>.
- 25 HAGMAN, R. Canine pyometra: What is new? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51,
26 n. 3, p. 1–5, 2016. <https://doi.org/10.1111/rda.12843>.
- 27 HAGMAN, R. **New aspects of canine pyometra - studies on epidemiology and**
28 **pathogenesis**. 2004. Thesis - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 2004 .

- 1 HAGMAN, R.; KINDAHL, H.; FRANSSON, B. A.; BERGSTROM, A.; HOLST, B. S.;
2 LAGERSTEDT, A. S. Differentiation between pyometra and cystic endometrial
3 hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F₂ α metabolite analysis. **Theriogenology**,
4 v. 66, n. 2, p. 198–206, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.11.002>.
- 5 HAGMAN, R., KUHN, I. Escherichia coli strains isolated from the uterus and urinary bladder
6 of bitches suffering from pyometra: Comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-
7 field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, v. 84, n. 1-2, p. 143–153, 2002.
8 [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00449-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00449-7).
- 9 HEIENE, R.; KRISTIENSEN, V.; TEIGE, J.; JANSEN, J. H. Renal histomorphology in dogs
10 with pyometra and control dogs, and long term clinical outcome with respect to signs of
11 kidney disease. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 49, p. 13, 2007.
12 <https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-13>.
- 13 HEIENE, R.; MOE, L.; MOLMEN, G. Calculation of urinary enzyme excretion, with renal
14 structure and function in dogs with pyometra. **Research in Veterinary Science**, v. 70, n. 2, p.
15 129–137, 2001. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2000.0451>.
- 16 HOFFMANN, B.; RIESENBECK, A.; KLEIN, R. Reproductive endocrinology of bitches.
17 **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 275–288, 1996.
18 [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01484-4](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01484-4).
- 19 JOHNSTON, O.; CASSIDY, H.; O'CONNELL, S.; O'RIORDAN, A.; GALLAGHER, W.;
20 MAGUIRE, P. B.; MCMORRAOW, T. Identification of α -2-microglobulin as a urinary
21 biomarker for chronic allograft nephropathy using proteomic methods. **Proteomics - Clinical**
22 **Applications**, v. 5, n. 7-8, p. 422–431, 2011. <https://doi.org/10.1002/prca.201000160>.
- 23 JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. **Canine and feline**
24 **theriogenology**. Philadelphia : Saunders, 2001. p.19-104.
- 25 KUPLULU, S.; VURAL, M. R.; DEMIREL, A.; POLAT, M.; AKÇAY, A. The comparative
26 evaluation of serum biochemical, haematological, bacteriological and clinical findings of dead
27 and recovered bitches with pyometra in the postoperative process. **Acta Veterinaria**, v. 59, n.
28 2-3, p. 193–204, 2009. <https://doi.org/10.2298/AVB0903193K>.
- 29 LI, R. H. L.; CHAN, D. L. Evaluation of platelet function using multiple electrode platelet

- 1 aggregometry in dogs with septic peritonitis. **Journal of Veterinary Emergency and**
2 **Critical Care**, v. 26, n. 5, p. 630–638, 2016. <https://doi.org/10.1111/vec.12508>.
- 3 MADDENS, B.; DAMINET, S.; SMETS, P.; MEYER, E. Escherichia coli Pyometra Induces
4 Transient Glomerular and Tubular Dysfunction in Dogs. **Journal of Veterinary Internal**
5 **Medicine**, v. 24, n. 6, p. 1263–1270, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0603.x>.
- 6 MADDENS, B.; HEIENE, R.; SMETS, P.; SVENSSON, M.; ARESU, L.; VAN DER LUGT,
7 J.; MEYER, E. Evaluation of Kidney Injury in Dogs with Pyometra Based on Proteinuria,
8 Renal Histomorphology, and Urinary Biomarkers. **Journal of Veterinary Internal**
9 **Medicine**, v. 25, n. 5, p. 1075–1083, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0772.x>.
- 10 MILLER, I.; PREBLMAYER-HARTLER, A.; WAIT, R.; HUMMEL, K.; SENSI, C.;
11 EBERINI, I.; GIANAZZA, E. In between - Proteomics of dog biological fluids. **Journal of**
12 **Proteomics**, v. 106, p. 30–45, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.016>.
- 13 NABITY, M. B.; LEES, G. E.; DANGOTT, L. J.; CIANCIOLO, R.; SUCHODOLSKI, J. S.;
14 STEINER, J. M. Proteomic analysis of urine from male dogs during early stages of
15 tubulointerstitial injury in a canine model of progressive glomerular disease. **Veterinary**
16 **Clinical Pathology**, v. 40, n. 2, p. 222–236, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00307.x>.
- 17
- 18 PALVIAINEN, M.; RAEKALLIO, M.; VAINIONPAA, M.; KOSONEN, S.; VAINIO, O.
19 Proteomic profiling of dog urine after European adder (*Vipera berus berus*) envenomation by
20 two-dimensional difference gel electrophoresis. **Toxicon**, v. 60, n. 7, p. 1228–1234, 2012.
21 <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.08.010>.
- 22 PRESSLER, B. M. Clinical Approach to Advanced Renal Function Testing in Dogs and Cats.
23 **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 43, n. 6, p. 1193–1208,
24 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2013.07.011>.
- 25 PRETZER, S. D. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review.
26 **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 359–363, 2008.
27 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.028>.
- 28 ROOT KUSTRITZ, M. V. Managing the Reproductive Cycle in the Bitch. **Veterinary**
29 **Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 42, n. 3, p. 423–437, 2012.

- 1 <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.01.012>.
- 2 SANT' ANNA, M. C.; GIORDANO, L. G. P.; FLAIBAN, K. K. M. C.; MULLER, E. E.;
3 MARTINS, M. I. M. Prognostic markers of canine pyometra. **Arquivo Brasileiro de**
4 **Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1711–1717, 2014.
5 <https://doi.org/10.1590/1678-6859>.
- 6 SCHANSTRA, J. P.; MISCHAK, H. Proteomic urinary biomarker approach in renal disease:
7 from discovery to implementation. **Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)**, v. 30, n. 5, p.
8 713–725, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00467-014-2790-y>.
- 9 SMETS, P. M. Y.; MEYER, E.; MADDENS, B. E. J.; DUCHATEAU, L.; DAMINET, S.
10 Urinary markers in healthy young and aged dogs and dogs with chronic kidney disease.
11 **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 1, p. 65–72, 2010.
12 <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0426.x>.
- 13 SPECHT, A.; CHAN, D.; O'TOOLE, T.; KENT, M.; BENSON, J. A.; ROZANSKI, E.;
14 RUSH, J. Acute staphylococcal peritonitis following cystocentesis in a dog. **Journal of**
15 **Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 12, n. 3, p. 183–187, 2002.
16 <https://doi.org/10.1046/j.1435-6935.2002.00037.x>.
- 17 SU, L.; CAO, L.; ZHOU, R.; JIANG, Z.; XIAO, K.; Kong, W.; XIE, L. Identification of
18 Novel Biomarkers for Sepsis Prognosis via Urinary Proteomic Analysis Using iTRAQ
19 Labeling and 2D-LC-MS/MS. **Plos one**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2013.
20 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054237>.
- 21 SUN, D.; RAISLEY, B.; LANGER, M.; IYER, J. K.; VEDHAM, V.; BALLARD, J. L.;
22 COGGESHALL, K. M. Anti-Peptidoglycan Antibodies and Fc Receptors Are the Key
23 Mediators of Inflammation in Gram-Positive Sepsis. **The Journal of Immunology**, v. 189, n.
24 5, p. 2423 – 2431, 2012. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201302>.
- 25 THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinaria**. São Paulo: Roca, 2007.
26 592p.
- 27 VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, G.; VERTEGEN-ONCLIN, K. Mucometra, cystic
28 endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: Advances in treatment and assessment of
29 future reproductive success. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 364–374, 2008.

1 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.036>.

2 ZARAGOZA, C.; BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J. A.; MANE, M. C. Canine
3 pyometra: A study of the urinary proteins by SDS-PAGE and Western blot. **Theriogenology**,
4 v. 61, n. 7-8, p. 1259–1272, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.07.019>.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1 **ARTIGO 2**

2

3 **Proteômica Urinária como Ferramenta para Identificação de Biomarcadores de Lesão**
4 **Renal Precoce em Cadelas com Piometra**5 **Urinary Proteomics as a Tool for Biomarker Detection in Early Injury in Bitches with**
6 **Pyometra**

7

8

9 **Resumo:** A insuficiência renal secundária à piometra canina é um dos fatores prognóstico
10 mais importantes relacionados à morbidade e mortalidade. Os métodos de identificação da
11 lesão renal, utilizados na rotina clínica, são pouco sensíveis na detecção precoce da lesão
12 renal e não identificam o compartimento renal acometido. O objetivo desse estudo foi
13 investigar proteínas urinárias biomarcadores de lesão precoce dos compartimentos renais de
14 cadelas com piometra. Para isso, 32 cadelas com piometra e 12 controles foram utilizadas. Os
15 perfis sanguíneo hematológico e bioquímico sérico foram utilizados para o diagnóstico e
16 confecção dos grupos, assim como, a cultura bacteriológica do conteúdo uterino. As proteínas
17 urinárias foram avaliadas por espectrometria de massas utilizando um *pool* das amostras de
18 urina dos grupos piometra por bactérias Gram-negativas azotêmicas (creatinina sérica > 1,7
19 mg/dL) e não azotêmicas, Gram-positivas azotêmicas (creatinina sérica > 1,7 mg/dL) e não
20 azotêmicas e grupo controle (cadela sem alterações sistêmicas). As principais proteínas
21 identificadas com potencial para biomarcadores de lesão renal precoce em cadelas com
22 piometra foram: clusterina, hepcidina, Ig Kappa cadeia V, lisozima C, proteína ligadora de
23 retinol, amiloide sérica A, proteína de domínio central de quatro disulfetos WAP e a
24 uromodulina. A maioria das proteínas possuem massa molecular menor que a albumina (69
25 kDa), o que sugere lesão no compartimento tubular renal. Esse estudo possibilitou a
26 identificação de proteínas com potencial para biomarcadores de lesão renal tubular precoce e
27 também sugeriu que a lesão renal em cadelas com piometra é principalmente de origem
28 tubular.

29

30 **Palavras chave:** Espectrometria de massas, proteinúria, insuficiência renal, hiperplasia
31 endometrial cística.

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

1 **Abstract:** Renal insufficiency secondary to canine pyometra is the most important prognostic
2 factors associated to morbidity and mortality. The methods used to identify renal lesions in
3 the clinical practice, are not sensitive in the early detection of renal damage and do not
4 identify the affected renal compartment. The aim of this study was to investigate urinary
5 proteins biomarkers of early lesion of kidney compartments of bitches with pyometra. For
6 this, 32 bitches with pyometra and 12 control bitches were used. The hematological blood
7 profile and serum biochemistry were used for the diagnosis and confection of the groups, as
8 well as the bacteriological culture of the uterine contents. Urinary proteins were evaluated by
9 mass spectrometry using a pool of urine samples from the pyometra groups by Gram-negative
10 azotemic (serum creatinine > 1.7 md/dL) and non-azotemic, Gram-positive azotemics (serum
11 creatinine > 1, 7 md / dL) and non-azotemics and control group (bitches without systemic
12 alterations). The main proteins identified with potential for biomarkers of early renal damage
13 in bitches with pyometra were: clusterin, hepcidin, Ig Kappa chain V, lysozyme C, retinol
14 binding protein, serum amyloid A, WAP four-disulfide core domain protein and uromodulin.
15 Most proteins have a lower molecular mass than albumin (69 kDa), suggesting damage to the
16 renal tubular compartment. This study allowed the identification of proteins with potential for
17 biomarkers of early tubular renal injury and also suggested that renal injury in bitches with
18 pyometra is mainly of tubular origin.

19
20 **Key words:** Mass spectrometry, proteinuria, renal failure, cystic endometrial hyperplasia,
21 canine.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

1 **Introdução**

2

3

4

5

6

7

8

9

10

A piometra canina é uma doença de caráter multissistêmico que acomete cadelas não castradas de meia idade e idosas geralmente durante o diestro (HAGMAN, 2004; PRETZER, 2008; HAGMAN, 2016). A principal bactéria envolvida na fisiopatogenia da piometra é a *Escherichia coli* (HAGMAN; KUHN, 2002; WEISS et al., 2004; VERSTEGEN; DHALIWAL; VERSTEGEN-ONCLIN, 2008; BASSESSAR et al., 2013). Entretanto, outras bactérias também podem infectar o útero de cadelas durante o diestro como *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas* spp, *Proteus* spp, dentre outras (WEISS et al., 2005; BASSESSAR et al., 2013; SANT' ANNA et al., 2014).

11

12

13

14

15

16

A lesão renal durante o decorrer da doença é o fator prognóstico negativo mais importante dessa afecção (KUPLULU, et al., 2009; SANT' ANNA., 2014), portanto, a identificação de biomarcadores de lesão renal precoce tem sido estudado (HEIENE, et al., 2007; MADDENS et al., 2010), uma vez que, os métodos utilizados na rotina clínica como a dosagem de creatinina sérica e a urinálise só detectam lesão renal quando este órgão já se encontra insuficiente (PRESSLER, 2013).

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

Em relação à lesão renal inicial causada durante a piometra canina, a utilização de biomarcadores urinários como a enzimúria, que detecta lesão renal tubular e a histopatologia renal, tem demonstrado que a principal diferença entre cadelas com piometra e as cadelas utilizadas como grupo controle está no compartimento tubular, e que as lesões glomerulares são semelhantes em cadelas com piometra e cadelas da mesma faixa etária (HEIENE et al., 2001; HEIENE et al., 2007). Entretanto, estudos utilizando biomarcadores proteicos urinários encontraram, tanto para lesão glomerular como lesão tubular, determinando que cadelas com piometra possuem lesão importante em ambos os compartimentos em comparação as cadelas do grupo controle (SMETS et al., 2010; MADDENS et al., 2011).

27

28

29

30

31

O plasma e o soro são ricos em proteínas e a interpretação dos resultados de biomarcadores proteicos se torna um desafio. Por outro lado as proteínas estão quase que ausentes na urina e particularmente estáveis nesse biofluido, tornando-a urina extremamente vantajosa para a busca de biomarcadores proteicos para diversas afecções, tanto sistêmicas como renais (SCHANSTRA; MISCHAK, 2015).

32

33

34

A interpretação da proteômica urinária leva em consideração que o glomérulo é responsável pela filtração de proteínas de intermediária ou alta massa molecular (MW), como a albumina (aproximadamente 69 kDa). Já os túbulos são responsáveis pela

1 reabsorção das proteínas de baixa MW, ou seja, menor que 69 kDa que são livremente
2 filtradas pelos glomérulos. Quando proteínas de intermediária ou alta MW como a albumina,
3 imunoglobulina G (150 kDa) e proteína C reativa, são encontradas na urina, é indicativo de
4 lesão glomerular. Por outro lado, quando as proteínas são de baixa MW como a proteína
5 ligadora de retinol (21 kDa) é interpretado como uma lesão tubular. Proteínas supracitadas são
6 utilizadas em estudos como marcadores de lesão renal em cadelas com piometra e também em
7 pacientes com doença renal crônica (MADDENS et al., 2010; SMETS et al., 2010;
8 GRAUER, 2011; DE LOOR et al., 2013 PRESSLER, 2013).

9 O objetivo desse estudo foi investigar proteínas urinárias biomarcadores de
10 lesão precoce dos compartimentos renais de cadelas com piometra.

11

12 **Material e Métodos**

13

14 Esse estudo foi conduzido de acordo com as normas éticas de
15 experimentação animal, aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal
16 Institucional, sob o número CEUA 28539201365.

17

18 *Animais*

19

20 Foram estudadas 44 cadelas das quais, 32 foram diagnosticadas com
21 piometra e 12 cadelas sem sinais sistêmicos. O sangue foi colhido na admissão das pacientes
22 para realização do hemograma completo e bioquímicos (creatinina, alamina aminotransferase,
23 glicose).

24

25 O conteúdo uterino das cadelas com piometra foi obtido de forma estéril
26 logo após a remoção do útero durante o tratamento cirúrgico dos pacientes para isolamento
27 microbiano, coloração de Gram e identificação das bactérias.

28

29 A urina foi colhida de forma estéril por cistocentese durante o procedimento
30 cirúrgico nas cadelas com piometra ou cadelas do grupo controle que passaram por celiotomia
31 ou guiada por ultrassom. As amostras de urina foram centrifugadas por 5 minutos a 1.500 g, e
32 o sobrenadante foi armazenado a -20°C para posterior análise.

33

34 Os grupos estudados foram formados de acordo com o tipo bactéria
35 identificada e a concentração da creatinina plasmática, Gram-negativa não azotêmicas
(GnegNA, n = 18), Gram-negativa azotêmicas (GnegA, n = 6), Gram-positiva não azotêmicas
(GposNA, n = 4) e Gram-positiva azotêmicas (GposA, n = 4) e grupo controle (GC, n = 12).

1 As cadelas foram consideradas azotêmicas quando a creatinina plasmática realizada na
2 admissão dos pacientes foi superior a 1,7 mg/dL.

3 A idade média das cadelas do grupo GnegNa foi de $6,7 \pm 4,3$ anos, do grupo
4 GnegA foi de $8,1 \pm 2,8$ anos, do grupo GposNA de $8,0 \pm 5,7$ anos, do grupo GposA de $11,0 \pm 2,1$
5 anos e do GC de $8,5 \pm 3,3$ anos.

6 O diagnóstico de piometra foi baseado nos resultados do exame clínico,
7 hemograma e exame ultrassonográfico abdominal, e confirmado durante o procedimento
8 cirúrgico por inspeção visual do útero, já que todas as cadelas com piometra foram tratadas
9 por ovariosterectomia (OHE).

10 O critério de inclusão para os grupos piometra foi a confirmação do
11 diagnóstico de piometra e o critério de exclusão foi a suspeita ou confirmação de qualquer
12 afecção concomitante. Os critérios de inclusão para o grupo controle foram cadelas adultas,
13 não castradas, sadias, que foram submetidas a procedimentos cirúrgicos como remoção de
14 cálculo dentário, OHE eletivas ou pequenas nodulectomias e que não apresentaram alterações
15 nos exames hematológicos e bioquímicos plasmáticos que foram realizados na admissão das
16 pacientes.

17 *Espectrometria de massas*

18 A espectrometria de massas foi realizada a partir do *pool* de urina de cada
19 grupo. Após a formação do *pool*, as amostras de cada grupo foram centrifugadas a 10.000 g
20 por 30 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi recolhido para análise de proteínas totais e
21 espectrometria de massas.
22
23

24 *Dosagem de proteínas totais*

25 A dosagem de proteínas totais foi realizada do *pool* de cada grupo pelo
26 método colorimétrico de Bradford (Bradford Reagent, B6916, Sigma-Adrich®, St. Louis,
27 MO, USA) em nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000C, Thermo Scientific). Para
28 determinação da concentração de proteína total utilizou-se uma diluição de 1:15 da amostra
29 reagente. Os resultados da concentração de proteínas totais de cada amostra foram calculadas
30 a partir de uma curva padrão estabelecida com concentrações conhecidas de albumina sérica
31 bovina.
32
33

1 *Digestão proteica em solução*

2
3 Para a digestão trípica das amostras, foram usados 50µg de proteína. A
4 metodologia utilizada foi a descrita por Villén e Gygi (2008) com modificações.

5 Uma alíquota contendo 50 µg de proteína em um volume máximo de 100
6 µL foi obtido de cada *pool*. Nessa, foi adicionado o mesmo volume (1:2) de uma solução
7 aquosa de ureia 8M. Para a redução e clivagem das pontes de dissulfetos formadas entre os
8 resíduos de cisteína acrescentou-se 5 mM na solução final de ditioneitol (DTT) diluído em
9 solução aquosa de bicarbonato de amônio 50 mM e mantida durante 25 minutos a 56° C em
10 banho seco. Após, foi adicionada iodoacetamida (IAA) em solução aquosa de bicarbonato de
11 amônio 50 mM na concentração de 14 mM na solução final e incubada durante 30 minutos à
12 temperatura ambiente em ambiente protegido da luz. Para retirada do excesso de IAA foi
13 adicionado DTT 5 mM preparado em solução aquosa de bicarbonato de amônia 50 mM na
14 solução final e novamente incubados por 15 minutos à temperatura ambiente e protegidos da
15 luz.

16 Para a redução da concentração de ureia em 1,6 M a amostra foi diluída na
17 proporção de 1:5 em 50 mM de bicarbonato de amônio e posteriormente foi adicionada uma
18 solução aquosa de cloreto de cálcio (CaCl₂) 1 mM na solução final.

19 A tripsina (*Sequence Grade Modified tripsina* V5111, Promega
20 Biotecnologia do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) foi acrescida nas amostras a 20 ng/µL em
21 solução aquosa de bicarbonato de amônio 50 mM na proporção de 1 : 50 de enzima/substrato
22 e incubadas durante 16h a 37° C em banho seco.

23 A ação da enzima foi então interrompida pela adição de ácido trifluoacético
24 (TFA) na concentração de 0,4%. O pH das amostras foi equalizado abaixo de 2,0 com a
25 adição de mais TFA 0,4% quando necessário. As amostras foram novamente centrifugadas a
26 2.500xg por 10 minutos em temperatura ambiente e o *pellet* foi descartado.

27 28 29 *Dessalinização de peptídeos*

30
31 A dessalinização dos peptídeos foi realizada utilizando coluna de fase
32 reversa (SepPack C18, Waters Corporations) de acordo com protocolo do fabricante.

1 Os reagentes utilizados foram: acetonitrila (ACN) 100%, 50/50 ACN / água
2 com 0,1% ácido fórmico, TFA 0,1% em água, 80/20 ACN / água com 0,1% ácido fórmico,
3 ácido fórmico 0,1% em água.

4 As colunas SepPack foram ativadas com 3mL de acetonitrila (ACN) 100%,
5 equilibradas com 1mL 50/50 ACN / água com 0,1% de ácido fórmico e 3mL de TFA 0,1%.
6 Em seguida, a coluna foi carregada com a amostra e lavada com 3mL de TFA 0,1% para
7 remover o sal e novamente equilibrada com 1mL de ácido fórmico 0,1%. Foram realizadas
8 duas eluições, a primeira com 2mL de 50/50 ACN / água com 0,1% de ácido fórmico e
9 coletado o que passou pela coluna em tubo plástico *LoBind* de 2mL e a segunda eluição com
10 1mL 80/20 ACN / água com 0,1% do ácido fórmico e novamente coletado o conteúdo que
11 passou pela coluna em tubo plástico *LoBind* de 2mL.

12 Após todas as amostras serem passadas em colunas SepPack como descrito
13 acima, as mesmas foram concentradas e centrifugados a vácuo (SPD1010 *Integrated Speed*
14 *Vacuum*, Waltham, MA, USA) e o *pellet* foi armazenado a -20° C até o dia da análise.

16 *Sequenciamento peptídico por LC-ESI QTOF*

17
18 As amostras foram descongeladas, diluídas em ácido fórmico 0,1% na
19 proporção de 0,7 µg de proteínas/µL. Após homogeneização em agitador de tubos as amostras
20 foram centrifugadas a 1.100 g por 5 minutos. O sobrenadante (20µL) foi depositado em tubos
21 específicos para análise por espectrômetro de massas, *clear glass 12 x 32 mm screw neck*
22 *total recovery vial* com tampa (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA). A
23 espectrometria de massas foi realizada no equipamento LC ESI-QTOF (Waters Corporation,
24 Milford, Massachusetts, EUA) no laboratório Nacional de Biociências (LnBio), do centro
25 Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, SP, Brasil.

26 Para a análise das proteínas, uma alíquota de 4,5 µL de proteína resultante
27 da digestão peptídica foi separada por coluna reversa C18 (100 µm x 100 mm) e acoplada ao
28 espectrômetro de massa com emissão de *nanoelectrospray* numa taxa de 0,600 µL/min, sendo
29 o gradiente de 2 – 90% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico durante 45 minutos. A
30 voltagem do *nanoelectrospray* foi ajustada em 3,5 kV com temperatura da fonte em 100°C. O
31 aparelho foi operado no modo *top three*. Após a fragmentação MS/MS, o íon foi colocado na
32 lista de exclusão por 60 segundos e a exclusão em tempo real foi utilizada para a análise dos
33 peptídeos endógenos clivados (ARAGÃO et al., 2012).

1 Os espectros foram obtidos usando software MassLynx v.4.1 (Water
2 Corporation, Miford, Massachusetts, EUA) e a busca dos íons MS/MS foi realizada com
3 sistema de pesquisa Mascot Distiller v.2.3.3.0, 2009 (Matrix Science) utilizando a taxonomia
4 *Mammalia*. Os parâmetros de procura incluíram carbamidometilação com modificação fixas,
5 oxidação de metionina com modificação variável, uma tripsina com perda de 1 clivagem e
6 tolerância de 0,1 Da para os íons precursor e fragmento (ARAGÃO et al., 2012).

7 Após a identificação das proteínas, os códigos das proteínas obtidos no
8 sistema Mascot foram inseridos no banco de dados UniprotKB (www.uniprot.com.br)
9 utilizando somente a taxonomia *Canis lupus familiaris* para pesquisa da ontologia gênica
10 usando as categorias função molecular, processo biológico e componente celular das proteínas
11 identificadas. Os códigos das proteínas obtidos no sistema Mascot também foram usados no
12 banco de dados de ontologia gênica Panther (www.pantherdb.org) para a confecção de
13 gráficos.

15 **Resultados e Discussão**

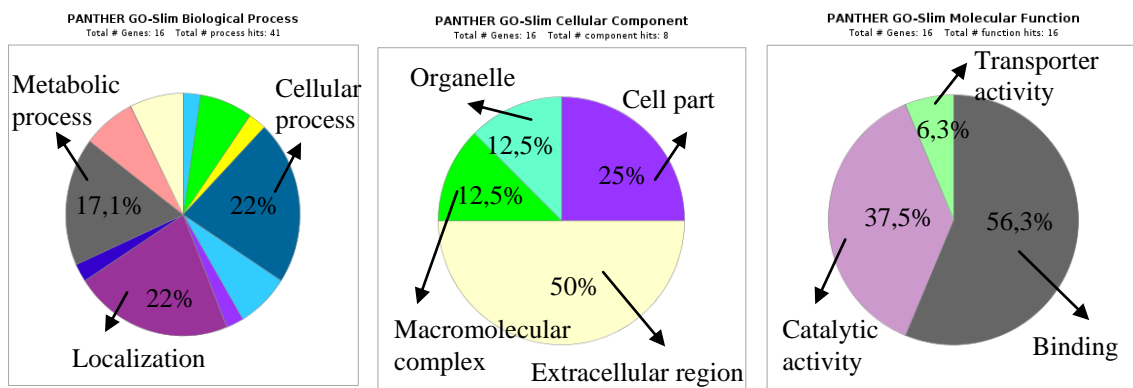
16
17 Das 32 cadelas com piometra, 24 foram ocasionadas por bactérias Gram-
18 negativas, sendo 14 por *Escherichia coli* e 4 por *Klebsiella* spp. As 5 restantes foram por
19 *Coccobacillus*, corineformes, *Proteus mirabillis*, *Enterobacter* spp e *Pseudomonas* spp. Das 8
20 cadelas com piometra por bactérias Gram-positivas 3 foram causadas por *Staphylococcus* spp,
21 3 por *Streptococcus* spp e 2 por *Enterococcus* spp. Essa diversidade na etiologia bacteriana e
22 o predomínio da *E. coli* também foi observada em outros estudos (WEISS et al., 2005;
23 COGGAN et al., 2008; EMANUELLI et al., 2012; BASSESSAR et al., 2013). A maior
24 prevalência da *E. coli* está relacionada com sua capacidade de aderir-se em sítios antigênicos
25 específicos no endométrio de cadelas que estão sob influência da progesterona e pela presença
26 de fatores de virulência, que também estão associados a insuficiência renal secundária a
27 piometra canina (JOHNSON et al., 1998; HAGMAN; KUHN, 2002).

28 A principal teoria que explica a insuficiência renal em cadelas com piometra
29 se baseia em que a lesão inicial ocorre no glomérulo secundária a deposição de
30 imunocomplexos desencadeando uma glomerulonefrite e posteriormente, insuficiência renal
31 (JOHNSTON et al., 2001; FIENI, 2006). Entretanto, com a evolução nas técnicas
32 diagnósticas, tanto histopatológicas como na descoberta de marcadores de lesão renal precoce,
33 estudos sugerem que a principal lesão renal secundária a piometra possa ser de origem
34 tubular, mas resultados conflitantes ainda são encontrados (ZARAGOZA et al., 2004;

1 HEIENE et al., 2007; MADDENS et al., 2011). O estudo proteômico urinário permite avaliar
 2 além de possíveis biomarcadores de lesão renal a possível interação das proteínas
 3 identificadas no processo patológico em questão. Para isso é necessário estudar as
 4 propriedades das proteínas presentes na urina (SU et al., 2013).

5 De todas as proteínas encontradas nesse estudo, as de ligação representam a
 6 função molecular mais prevalente, seguida pelas proteínas com atividade catalítica e proteínas
 7 com atividade de transporte. Em relação ao componente celular, 50% das proteínas
 8 identificadas são da região extracelular, 25% com localização intracelular, 12,5% são de
 9 organelas e 12,5% são do complexo macromolecular. Os principais processos biológicos
 10 identificados foram proteínas ligadas ao processo celular, proteínas de localização e proteínas
 11 que fazem parte de processos metabólicos (Figura 1). Em estudo recente, mais de 500
 12 proteínas presentes na urina de cadelas saudáveis foram identificadas por meio da espectrometria
 13 de massas. De acordo com a função molecular as proteínas de ligação e com atividade
 14 catalítica foram as mais prevalentes. Em relação ao componente celular, as proteínas solúveis
 15 foram da região extracelular e os exossomos de localização intracelular. Em relação ao
 16 processo biológico, as proteínas ligadas ao processo celular como no desenvolvimento do
 17 ectoderma e epiderme (BRANDT et al., 2014). Tais achados se assemelham com o estudo em
 18 questão.

19
 20 Figura 1. Distribuição do processo biológico, componente celular e função molecular das
 21 proteínas identificadas na urina de cadelas com piometra e do grupo controle.



22
 23
 24 A maioria das proteínas encontradas nesse estudo foram de baixa MW.
 25 Somente três proteínas identificadas possuíam MW intermediária, a caderina (98 kDa), a
 26 uromodulina (72 kDa) e a albumina (70 kDa). As demais possuíam MW variando de 9 a 52
 27 kDa. E exceto pela uromodulina, que é uma proteína secretada pelas células tubulares e por

1 isso não é filtrada pelos glomérulos, tanto a caderina como a albumina além de serem
2 identificadas no *pool* urinário das cadelas com piometra também foram encontradas nas
3 cadelas do GC. Portanto, as principais proteínas presentes na urina de cadelas com piometra
4 que não foram encontradas nas cadelas do GC são proteínas de origem tubular, o que sugere
5 que a lesão renal primária nas cadelas com piometra é tubular (Tabela 1).

6 Zaragoza et al. (2004) estudaram por meio de eletroforese em gel de
7 poliacrilamida as proteínas urinárias de cadelas com piometra e cadelas saudias e também
8 detectaram que cadelas com piometra apresentaram maior quantidade de proteínas de baixa
9 MW em relação as cadelas do grupo controle, enquanto que proteínas de MW intermediária
10 estavam presentes nos dois grupos. Apesar de resultados semelhantes, no nosso estudo as
11 proteínas foram identificadas. Heiene et al. (2007) também estudaram a lesão renal na
12 piometra canina, mas por dosagem de enzimas urinárias, gama glutamil transferase (GGT),
13 fosfatase alcalina (FA) e N-Acetil-B-D-glucosaminidase (NAG), que são marcadores de lesão
14 tubular e por histopatologia renal e concluíram que a principal diferença entre as cadelas com
15 piometra e as cadelas do grupo controle foram no compartimento tubular.

16 A Tabela 1 também demonstra as proteínas identificadas nas cadelas com
17 piometra por bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e GC. Dentre estas podem ser
18 destacadas, a clusterina, proteína secretora epididimária, hepcidina, Ig Kappa cadeia V,
19 lisozima C, proteína ligadora de retinol (RBP), amiloide sérica A, proteína de domínio central
20 de quatro disulfetos WAP e a uromodulina que não foram identificadas no *pool* urinário do
21 GC mas foram identificadas nos grupos GnegNA, GnegA e/ou GposNA, GposA, portanto,
22 apresentam características para biomarcadores de lesão renal em cadelas com piometra.

23

24

25

26

27

28

29

30

31

1 Tabela 1. Relação das proteínas urinárias identificadas, sua massa molecular e distribuição
 2 entre os grupos Gram-negativas não azotêmicas (GnegNA), Gram-negativas Azotêmicas
 3 (GnegA), Gram-positivas não azotêmicas (GposNA), Gram-positivas azotêmicas (GposA) e
 4 controle.

Proteínas identificadas	Massa (kDa)	GnegNA	GnegA	GposNA	GposA	Controle
Anionic trypsin	27	+	NI	NI	NI	NI
Apolipoprotein	30	+	+	NI	NI	+
Beta-lactoglobulin - 1	18	+	+	+	+	+
Beta-lactoglobulin - 2	18	+	+	NI	NI	+
Cadherin	98	NI	NI	+	NI	NI
Clusterin	52	+	+	+	+	NI
Copper transport protein	7	+	NI	NI	NI	NI
Deoxyribonuclease - 1	31	NI	NI	NI	NI	+
Epididymal secretory protein	16	+	+	+	+	NI
Haptoglobin	36	+	+	+	+	+
Hepcidin	9	+	+	+	+	NI
Ig heavy chain V region GOM	12	NI	+	NI	+	+
Ig heavy chain V region MOO	12	+	NI	+	NI	NI
Ig kappa chain V	12	+	+	+	+	NI
Junction adhesion molecule	32	+	NI	+	+	+
Lysozyme C	15	+	+	+	+	NI
Prostaglandin-H2 D-isomerase	21	NI	+	NI	+	NI
Retinol-binding protein	23	+	+	+	+	NI
Serum albumin	70	+	+	+	+	+
Serum amyloid A	14	NI	+	+	+	NI
Uromodulin	72	+	+	NI	NI	NI
WAP four-disulfide core domain protein	13	+	+	+	+	NI

5 *Proteínas em negrito foram encontradas no pool das cadelas com piometra e não foram identificadas (NI) no
 6 grupo controle.
 7

8

9

10

11

1 Em relação as proteínas identificadas nas cadelas com piometra por
2 bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, nenhuma diferença marcante foi observada. Tal
3 evidência pode ser devido ao mecanismo patológico da lesão renal induzida, secundária a
4 infecção, ser semelhante entre tais grupos.

5 Nenhum estudo proteômico urinário em cadelas com piometra foi
6 encontrado na literatura disponível. Entretanto, estudo similar em cães com nefropatia
7 hereditária que ocasiona o desenvolvimento de glomerulopatia grave, identificou por
8 espectrometria de massas diversas proteínas com potencial para biomarcadores (NABITY et
9 al., 2011), dentre elas a proteína ligadora de retinol (RBP), sendo a única também sugerida
10 como biomarcador no nosso estudo. Outras proteínas isoladas foram hemopexina,
11 apolipoproteína, haptoglobina, molécula de adesão juncional e imunoglobulina. Dessas, a
12 apolipoproteína, a molécula de adesão juncional e a haptoglobina foram detectadas nas cadelas
13 com piometra desse estudo, mas também foram identificadas nas cadelas do GC. Por esse
14 motivo, não foram listadas como possíveis biomarcadores de lesão renal em cadelas com
15 piometra.

16 Outro estudo proteômico urinário por espectrometria de massas foi realizado
17 em cães que sofreram acidente ofídico com efeito nefrotóxico e comparadas com a
18 proteômica de cadelas saudáveis. As proteínas identificadas diferiram entre os grupos, sendo que,
19 a antitripsina alfa-1, albumina, microglobulina beta-2, fetuina-B, superóxido dismutase
20 estavam presentes nos cães que sofreram acidente ofídico (PALVIAINEN et al., 2012). Tais
21 proteínas também não foram sugestivas para biomarcadores de lesão renal em cadelas com
22 piometra no estudo em questão.

23 Dentre as proteínas identificadas como possíveis biomarcadores de lesão
24 renal em cadelas com piometra nesse estudo, a clusterina foi estudada em cães como possível
25 marcador de lesão renal tubular precoce em cães com leishmaniose com diferente
26 comprometimento renal e cães saudáveis e, mostrou ser eficaz na detecção lesão renal antes
27 do desenvolvimento da azotemia e da elevação da UPC (GARCIA-MATINEZ et al., 2012). A
28 hepcidina foi estudada em humanos com doença renal crônica e disfunção tubular e em ratos
29 com deficiência na megalina, que está ligada a reabsorção tubular e ficou concluído que além
30 da hepcidina ser reabsorvida pelos túbulos, também está aumentada na urina quando há lesão
31 tubular (PETERS et al., 2013).

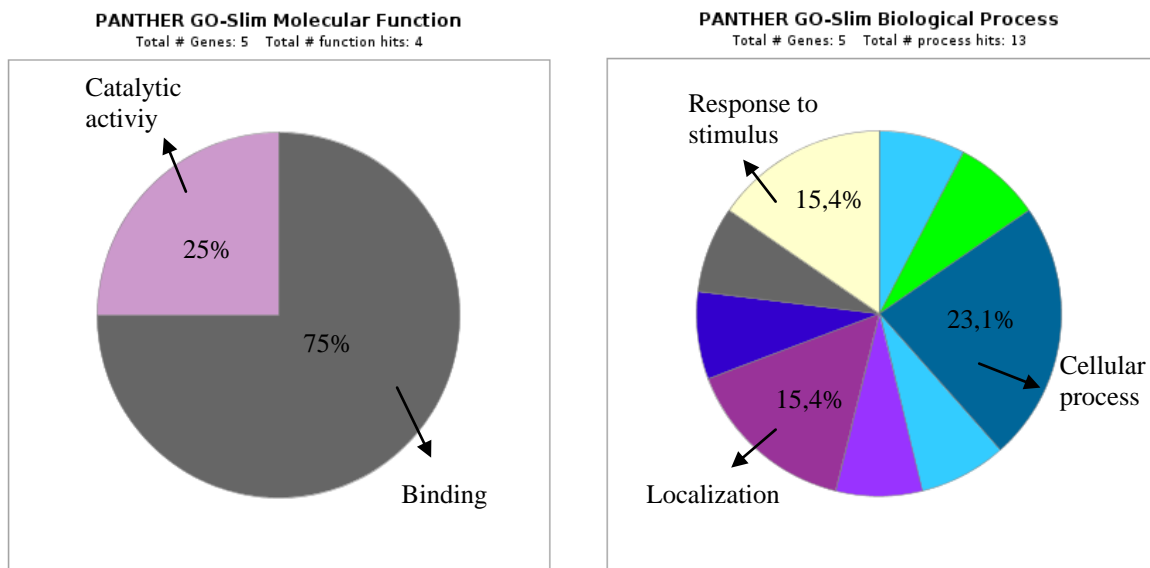
32 A lisozima C foi estudada em modelo canino de choque séptico por
33 *Pseudomonas aeruginosa*. As amostras de tecidos renais, hepáticos e intestinais foram
34 coletados para avaliar a presença tecidual e participação da lisozima C no choque séptico e na

1 lesão renal e encontraram que a lisozima C pode estar envolvida na ativação dos padrões
2 inflamatórios dos túbulos renais (GOTES et al., 2014). A RBP urinária foi avaliada em
3 cadelas com piometra e mostrou ser mais sensível na detecção de lesão renal tubular que a
4 UPC (MADDENS et al., 2011). A uromodulina ou proteína de Tamm-Horsfall é produzida
5 nos túbulos renais, possui certo efeito modulador inflamatório e é considerada protetor renal
6 (EL-ACHKAR; WU, 2012). Em cães a relação uromodulina creatinina urinária foi diminuída
7 em cães com doença renal em estadiamento avançado em relação a cães saudáveis e com
8 doença renal em estadiamento inicial, evidenciando o seu uso como marcador de severidade
9 da lesão renal (RAILA; SCHWEGERT; KOHN, 2014).

10 Quando analisamos a ontologia gênica das proteínas que foram identificadas
11 como possíveis marcadores de lesão renal nesse estudo, encontramos que as proteínas de
12 ligação representaram 75% da função molecular e os 25% restantes são proteínas de atividade
13 catalítica. Em relação ao processo biológico, diversas categorias de proteínas foram
14 encontradas, como proteínas de adesão biológica, regulação biológica, processo celular,
15 processo de desenvolvimento, processos do sistema imune, localização, locomoção, processo
16 metabólico e resposta a estímulos (Figura 2). A região extracelular representou 100% das
17 proteínas em relação ao componente celular. Tais características foram encontradas na fração
18 solúvel da urina em estudo que caracterizou a proteômica urinária em cães (BRANDT et al.,
19 2014). A ontologia gênica das proteínas com características de biomarcadores nesse estudo
20 reflete, provavelmente, a origem sérica de tais proteínas, pois durante o processo inflamatório
21 intenso que acontece na piometra, ocorre aumento significativo das proteínas plasmáticas
22 ligadas a inflamação. O aumento das proteínas plasmáticas promove sobrecarga renal, e
23 associada a lesão renal tubular secundária a sepse durante a piometra, são os fatores
24 responsáveis pelo aparecimento das proteínas de baixa MW identificadas como marcadores de
25 lesão renal nesse estudo.

26
27
28
29
30
31
32
33
34

1 Figura 2. Distribuição da função molecular e processo biológico das proteínas identificadas
 2 como possíveis marcadores de lesão renal precoce em cadelas com piometra.



3

4

5

6 Conclusão

7

8

9 Esse trabalho identificou várias proteínas na urina de cadelas com piometra
 10 que não foram identificadas no grupo controle, portanto, com potencial para serem utilizadas
 11 como biomarcadores de lesão renal precoce nessa infecção. De acordo com a massa molecular
 12 dessas proteínas a principal lesão renal em cadelas com piometra é de origem tubular, tanto
 13 em cadelas com piometra por bactérias Gram-negativas como por Gram-positivas. As
 14 proteínas de origem glomerular foram identificadas nas cadelas com piometra e no grupo
 15 controle, o que mostra que a alteração nesse compartimento renal em cadelas com piometra
 16 pode ser pré-existente e relacionada a alterações renais senis.

16

17

18

19

20

21

22

23

24

1 Referências

- 2
- 3 ARAGÃO, A. Z. B.; BELLONI, M.; SIMABUCO, F. M.; ZANETTI, M. R.; YOKOO S.
4 Novel processed form of syndecan-1 shed from SCC-0 cell plays a role in cell migration. **Plos**
5 **One**, v. 7, n. 8, e43521. doi: 10.1371/journal.pone.0043521.
- 6 BARBOSA, E. B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G. M.; HENRIQUE, T.; MARQUI, A. B.
7 T.; TAJARA, E. H. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas.
8 **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366–375, 2012.
9 <https://doi.org/10.1590/S0104-42302012000300019>.
- 10 BASSESSAR, V.; VERMA, Y.; SWAMY, M. Antibiofilm of bacterial species isolated from
11 canine pyometra. **Veterinary World**, v. 6, n. 8, p. 546–549, 2013.
12 <https://doi.org/10.5455/vetworld.2013.546-549>.
- 13 BRANDT, L. E.; EHRHART, E. J.; SCHERMAN, H.; OLVER, C. S.; BOHN, A. A.;
14 PRENNI, J. E. Characterization of the canine urinary proteome. **Veterinary Clinical**
15 **Pathology**, v. 43, n. 2, p. 193–205, 2014. <https://doi.org/10.1111/vcp.12147>.
- 16 COGGAN, J. A.; MELVILLE, P. A.; OLIVEIRA, C. M., FAUSTINO, M., MORENO, A. M.;
17 BENITES, N. R. Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra. **Brazilian**
18 **Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 477–483, 2008. [https://doi.org/10.1590/S1517-](https://doi.org/10.1590/S1517-838220080003000012)
19 [838220080003000012](https://doi.org/10.1590/S1517-838220080003000012).
- 20 DE LOOR, J.; DAMINET, S.; SMETS, P.; MADDENS, B.; MEYER, E. Urinary biomarkers
21 for acute kidney injury in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine / American**
22 **College of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 5, p. 998–1010, 2013.
23 <https://doi.org/10.1111/jvim.12155>.
- 24 EL-ACHKAR, T. M.; WU, X. In Translation Uromodulin in Kidney Injury: An Instigator,
25 Bystander, or Protector? **American Journal of Kidney Diseases**, v. 59, n. 3, p. 452–461, 2012.
26 <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2011.10.054>.
- 27 EMANUELLI, M. P.; MARTINS, D. B.; WOLKMER, P.; ANTONIAZZI, A. Q.;
28 EMANUELLI, T.; VARGAS, A. C.; DOS ANJOS LOPES, S. T. Complete blood count, total
29 plasma protein, neutrophil oxidative metabolism, and lipid peroxidation in female dogs with
30 pyometra associated with *Escherichia coli*. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, n. 3, p.

- 1 309–313, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-1097-z>.
- 2 FIENI, F. Patología de los ovários y el útero in: WANKE, M. M.; GOBELLO, C.
3 **Reproduccion en Caninos y Felinos Domesticos**. 1ª ed., Buenos Aires: Ed. Inter-Médica,
4 2006, p. 75-89.
- 5 GARCIA-MARTINES, J. D.; TVARIJONAVICIUTE, A.; CERON, J. J.; CALDIN, M.;
6 MARTINEZ-SUBIELA, S. Urinary clusterin as a renal marker in dogs. **Journal of**
7 **Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 2, p. 301–6,
8 2012. <https://doi.org/10.1177/1040638711435112>.
- 9 GOTES, J.; KASIAN, K.; JACOBS, H.; CHENG, Z.-Q.; MINK, S. N. Lysozyme, a Mediator
10 of Sepsis That Deposits in the Systemic Vasculature and Kidney as a Possible Mechanism of
11 Acute Organ Dysfunction. **Shock**, v. 41, n. 3, p. 256–265, 2014.
12 <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000095>.
- 13 GRAUER, G. F. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. **Veterinary**
14 **Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 35, n. 3, p. 581–596, 2005.
15 <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2004.12.013>.
- 16 GRAUER, G. F. Proteinuria: Measurement and Interpretation. **Topics in Companion Animal**
17 **Medicine**, v. 26, n. 3, p. 121–127, 2011. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.002>.
- 18 HAGMAN, R. Canine pyometra: What is new? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51,
19 n. 3, p. 1–5, 2016. <https://doi.org/10.1111/rda.12843>.
- 20 HAGMAN, R. **New aspects of canine pyometra - studies on epidemiology and**
21 **pathogenesis**. 2004. Thesis - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 2004 .
- 22 HAGMAN, R., KUHN, I. Escherichia coli strains isolated from the uterus and urinary bladder
23 of bitches suffering from pyometra: Comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-
24 field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, v. 84, n. 1-2, p. 143–153, 2002.
25 [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00449-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00449-7).
- 26 HEIENE, R.; KRISTIANSEN, V.; TEIGE, J.; JANSEN, J. H. Renal histomorphology in dogs
27 with pyometra and control dogs, and long term clinical outcome with respect to signs of
28 kidney disease. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 49, p. 13, 2007.

- 1 <https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-13>.
- 2 HEIENE, R.; MOE, L.; MOLMEN, G. Calculation of urinary enzyme excretion, with renal
3 structure and function in dogs with pyometra. **Research in Veterinary Science**, v. 70, n. 2, p.
4 129–137, 2001. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2000.0451>.
- 5 HOLT, J.; KRIE, N.; SNEATH, P. 1994: **Bergey's manual of determinative bacteriology**
6 (9ed). Williams & Wilkins, pp. 186-187.
- 7 JOHNSON, J. R.; BROWN, J. J.; CARLINO, U. B.; RUSSO, T. A. Colonization with and
8 acquisition of uropathogenic *Escherichia coli* as revealed by polymerase chain reaction-based
9 detection. **Journal Infection Disease**, v.177, p. 1120-1124, 1998.
- 10 JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. **Canine and feline**
11 **theriogenology**. Philadelphia : Saunders, 2001. p.19-104.
- 12 KUPLULU, S.; VURAL, M. R.; DEMIREL, A.; POLAT, M.; AKÇAY, A. The comparative
13 evaluation of serum biochemical, haematological, bacteriological and clinical findings of dead
14 and recovered bitches with pyometra in the postoperative process. **Acta Veterinaria**, v. 59, n.
15 2-3, p. 193–204, 2009. <https://doi.org/10.2298/AVB0903193K>.
- 16 MADDENS, B.; DAMINET, S.; SMETS, P.; MEYER, E. *Escherichia coli* Pyometra Induces
17 Transient Glomerular and Tubular Dysfunction in Dogs. **Journal of Veterinary Internal**
18 **Medicine**, v. 24, n. 6, p. 1263–1270, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0603.x>.
- 19 MADDENS, B.; HEIENE, R.; SMETS, P.; SVENSSON, M.; ARESU, L.; VAN DER LUGT,
20 J.; MEYER, E. Evaluation of Kidney Injury in Dogs with Pyometra Based on Proteinuria,
21 Renal Histomorphology, and Urinary Biomarkers. **Journal of Veterinary Internal**
22 **Medicine**, v. 25, n. 5, p. 1075–1083, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0772.x>.
- 23 NABITY, M. B.; LEES, G. E.; DANGOTT, L. J.; CIANCIOLO, R.; SUCHODOLSKI, J. S.;
24 STEINER, J. M. Proteomic analysis of urine from male dogs during early stages of
25 tubulointerstitial injury in a canine model of progressive glomerular disease. **Veterinary**
26 **Clinical Pathology**, v. 40, n. 2, p. 222–236, 2011. [https://doi.org/10.1111/j.1939-](https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00307.x)
27 [165X.2011.00307.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00307.x).
- 28 PALVIAINEN, M.; RAEKALLIO, M.; VAINIONPAA, M.; KOSONEN, S.; VAINIO, O.

- 1 Proteomic profiling of dog urine after European adder (*Vipera berus berus*) envenomation by
2 two-dimensional difference gel electrophoresis. **Toxicon**, v. 60, n. 7, p. 1228–1234, 2012.
3 <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.08.010>.
- 4 PETERS, H. P.; LAARAKKERS, C. M.; PICKKERS, P.; MASEREEUW, R.; BOERMAN,
5 O. C.; EEK, A.; WETZELS, J. F. Tubular reabsorption and local production of urine
6 hepcidin-25. **BMC Nephrology**, v. 14, n. 1, pp. 1, 2013. [https://doi.org/10.1186/1471-2369-](https://doi.org/10.1186/1471-2369-14-70)
7 14-70.
- 8 PRESSLER, B. M. Clinical Approach to Advanced Renal Function Testing in Dogs and Cats.
9 **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 43, n. 6, p. 1193–1208,
10 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2013.07.011>.
- 11 PRETZER, S. D. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review.
12 **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 359–363, 2008.
13 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.028>.
- 14 RAILA, J.; SCHWEIGERT, F. J.; KOHN, B. Relationship between urinary Tamm – Horsfall
15 protein excretion and renal function in dogs with naturally occurring renal disease.
16 **Veterinary clinical pathology**, v. 43, n. 2, p. 261–265, 2014.
17 <https://doi.org/10.1111/vcp.12143>
- 18 SANT' ANNA, M. C.; GIORDANO, L. G. P.; FLAIBAN, K. K. M. C.; MULLER, E. E.;
19 MARTINS, M. I. M. Prognostic markers of canine pyometra. **Arquivo Brasileiro de**
20 **Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1711–1717, 2014.
21 <https://doi.org/10.1590/1678-6859>.
- 22 SCHANSTRA, J. P.; MISCHAK, H. Proteomic urinary biomarker approach in renal disease:
23 from discovery to implementation. **Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)**, v. 30, n. 5, p.
24 713–725, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00467-014-2790-y>.
- 25 SMETS, P. M. Y.; MEYER, E.; MADDENS, B. E. J.; DUCHATEAU, L.; DAMINET, S.
26 Urinary markers in healthy young and aged dogs and dogs with chronic kidney disease.
27 **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 1, p. 65–72, 2010.
28 <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0426.x>.
- 29 THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinaria**. São Paulo: Roca, 2007.

1 592p.

2 VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, G.; VERTEGEN-ONCLIN, K. Mucometra, cystic
3 endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: Advances in treatment and assessment of
4 future reproductive success. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 364–374, 2008.
5 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.036>.

6 VILLÉN, J.; GYGI, S. P. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation
7 analysis by mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 3, n. 10, p. 1630 -1638, 2008.

8 WEISS, R. R.; CALOMENO, M. A.; SOUSA, R. S.; BRIERSDORF, S. M.; CALOMENO,
9 R. A.; MURADÁS, P. Avaliação Histológica, Hormonal e Bacteriológica da Piometra na
10 cadela. **Archives of Veterinary Science**, v.9, n.2, p. 81-87, 2004.

11 ZARAGOZA, C.; BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J. A.; MANE, M. C. Canine
12 pyometra: A study of the urinary proteins by SDS-PAGE and Western blot. **Theriogenology**,
13 v. 61, n. 7-8, p. 1259–1272, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.07.019>.

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

1 6. CONCLUSÕES

2
3 A lesão renal durante a piometra canina possui correlação com o
4 agravamento do *status* inflamatório e de acordo com o estudo proteômico urinário a maioria
5 das proteínas identificadas nas cadelas com piometra possuíam massa molecular que foi
6 compatível com lesão tubular.

7 A UPC se mostrou eficaz para detectar lesão renal em cadelas com piometra
8 antes do desenvolvimento da azotemia e sendo indicada para monitoração do paciente no
9 período pós-operatório para que seja feito o diagnóstico precoce de dano renal persistente
10 visando o melhor tratamento e a sobrevida dos pacientes.

11 Diversas proteínas foram identificadas na urina de cadelas com piometra
12 com potencial para biomarcadores de lesão renal tubular. Tais proteínas podem ser utilizadas
13 em estudos posteriores para o desenvolvimento de testes laboratoriais que possam ser
14 utilizados na rotina clínica.

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

APÊNDICE A

1
2
3
4
5

Proteínas urinárias identificadas em cadelas com piometra e sua respectiva ontologia gênica (função molecular, processo biológico, componente celular) obtida no banco de dados UNIPROT (www.uniprot.org)

Código	Proteína	Função molecular	Processo biológico	Componente celular
P06872	Anionic trypsin	Calcium ion binding. Serine-type. Endopeptidase activity.	Collagen catabolic process. Digestion. Proteolysis	Extracellular region. Extracellular space.
P02648	Apolipoprotein A-I	Cholesterol binding. Cholesterol transporter activity. High-density lipoprotein particle receptor binding.	Cholesterol biosynthetic process. Cholesterol efflux. Cholesterol homeostasis. High-density lipoprotein particle assembly.	Blood microparticle. Chylomicron High-density lipoprotein particle.
P33685	Beta-lactoglobulin - 1	Retinol binding.	Transport.	Extracellular region.
P33686	Beta-lactoglobulin - 2	Retinol binding.	Transport.	Extracellular region.
F1PAA9	Cadherin - 1	Calcium ion binding. Glycoprotein binding.	Adherens junction organization. Cellular response to indole-3-methanol. Cellular response to lithium ion. Establishment of protein localization to plasma membrane.	Cell junction. Cell membrane. Endosome. Golgi apparatus.
P25473	Clusterin	Chaperone binding. Misfolded protein binding. Ubiquitin protein ligase binding.	Chaperone-mediated protein folding. Intrinsic apoptotic signaling pathway. Negative regulation of intrinsic Apoptotic signaling pathway in response to DNA damage.	Chromaffin granule. Cytosol. Endoplasmic reticulum lumen. Extracellular space. Golgi apparatus. Mitochondrial membrane. Nucleus.
Q9TT99	Copper transport protein ATOX1	Copper chaperone activity.	Cellular copper ion homeostasis. Intracellular copper ion transport. Response to oxidative stress	Cytoplasm.
Q767J3	Deoxyribonuclease - 1	Deoxyribonuclease I activity.	Apoptotic process. DNA catabolic process.	Extracellular exosome. Nuclear envelope. Nucleus.
Q28895	Epididymal secretory protein E1	Cholesterol binding.	Cholesterol efflux. Cholesterol metabolic process. Cholesterol transport. Intracellular cholesterol transport.	Endoplasmic reticulum. Extracellular region. Lysosome.
P19006	Haptoglobin	Antioxidant activity. Hemoglobin binding.	Acute-phase response. Defense response to bacterium. Immune system process.	Extracellular space.
Q5U9D2	Hepcidin	Hormone activity. Iron channel inhibitor activity.	Cellular iron ion homeostasis. Defense response to bacterium. Negative regulation of iron ion transmembrane transport.	Extracellular space.

6

1 Continuação

P01784	Ig heavy chain V region GOM	Antigen binding.		
P01785	Ig heavy chain V region MOO	Antigen binding.		
P01618	Ig kappa chain V region GOM	Antigen binding.		
Q9Y624	Junction adhesion molecule A	Cadherin binding involved in cell-cell adhesion. PDZ domain binding. Virus receptor activity.	Actomyosin structure organization. Establishment of endothelial intestinal barrier. Establishment of protein localization to plasma membrane. Leukocyte migration. Positive regulation of blood pressure. Regulation of cytokine production. Regulation of membrane permeability.	Bicellular tight junction. Cell-cell adherens junction. Cell-cell junction. Cell junction. Cytoplasmic vesicle. Extracellular exosome. Integral component of membrane. Microtubule cytoskeleton. Plasma membrane. Slit diaphragm.
P81709	Lysozyme C, spleen isozyme	Catalysis of the hydrolysis of the beta-(1->4) linkages between N-acetylmuramic acid and N-acetyl-D- glucosamine residues in a peptidoglycan.	Cytolysis. Defense response to bacterium. Metabolic process.	
Q9XS65	Prostaglandin-H2 D- isomerase	Prostaglandin-D synthase activity. Retinoid binding. Small molecule binding. Transporter activity.	Prostaglandin biosynthetic process. Transport.	Extracellular region. Golgi apparatus. Nuclear membrane. Perinuclear region of cytoplasm. Rough endoplasmic reticulum.
P02753	Retinol-binding protein 4	Retinal binding. Retinol binding. Retinol transporter activity.	Glucose homeostasis. Positive regulation of immunoglobulin secretion. Retinoid metabolic process.	Cytosol. Extracellular exosome. Extracellular region. Extracellular space. Protein complex.
P49822	Serum albumin	DNA binding Source. Drug binding. Fatty acid binding. Metal ion binding. Pyridoxal phosphate binding. Toxic substance binding.	Cellular response to starvation. Hemolysis by symbiont of host erythrocytes. Maintenance of mitochondrion location. Negative regulation of apoptotic process. Transport.	Extracellular space.
P19708	Serum amyloid A protein	Chemoattractant activity.	Acute-phase response. Cell chemotaxis.	Extracellular space. High-density lipoprotein particle.
Q862Z3	Uromodulin	Calcium ion binding.		Anchored component of membrane. Apical plasma membrane. Basolateral plasma membrane. Ciliary membrane. Cilium. Extracellular region. Spindle pole.
Q28894	WAP four-disulfide core domain protein 2	Aspartic-type endopeptidase inhibitor activity. Cysteine- type endopeptidase inhibitor		Extracellular region.

1