

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Parâmetros bioquímicos e citológicos associados com a identificação bacteriana em
efusões sépticas em cães e gatos**

Tânia Marta Ferraboli

**Porto Alegre
2024**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Parâmetros bioquímicos e citológicos associados com a identificação bacteriana em efusões sépticas em cães e gatos

Autora: Tânia Marta Ferraboli

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Profa. Dra. Stella de Faria Valle.

Porto Alegre

2024

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

CIP - Catalogação na Publicação

Ferraboli, Tânia Marta

Parâmetros bioquímicos e citológicos associados com a identificação bacteriana em efusões sépticas em cães e gatos / Tânia Marta Ferraboli. -- 2024.

56 f.

Orientadora: Stella de Faria Valle.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Neutrófilos . 2. Bactérias . 3. efusão . 4. Cães . 5. Gatos . I. de Faria Valle, Stella, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Tânia Marta Ferraboli

Parâmetros bioquímicos e citológicos associados com a identificação bacteriana em efusões sépticas em cães e gatos

Aprovado em 22/03/2024

APROVADO POR:

Prof. Dra. Stella de Faria Valle – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Cinthia Melazzo de Andrade – Universidade Federal de Santa Maria – UFSM
Membro da Comissão Avaliadora

Prof. Dr. Paulo Fernandes Marcusso – Universidade Estadual Paulista – UNESP
Membro da Comissão Avaliadora

Prof. Dra. Amanda Muliterno Domingues Lourenço de Lima- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
Membro da Comissão Avaliadora

Caminha que a vida te encontra!

Surama Jurdi.

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E CITOLÓGICOS ASSOCIADOS COM A IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA EM EFUSÕES SÉPTICAS EM CÃES E GATOS

Autora: Tânia Marta Ferraboli

Orientadora: Stella de Faria Valle

RESUMO

O diagnóstico sensível e específico de efusões sépticas vem se tornando cada vez mais necessário na medicina veterinária, visto que a taxa de letalidade dos animais que apresentam piotórax ou peritonite é alta. A célula encontrada em maior quantidade nos exsudatos é o neutrófilo e alterações de degeneração celular podem estar relacionadas com a presença de bactérias. A mensuração de parâmetros bioquímicos como glicose e lactato aliados à confirmação da presença de bactérias por métodos mais simples, rápidos e sensíveis podem facilitar a identificação das efusões sépticas. Esse estudo buscou associar a morfologia dos neutrófilos com os demais parâmetros citológicos, bioquímicos, cultura bacteriológica e identificação pela metodologia do Maldi-Tof em líquidos cavitários de cães e gatos. Para tanto, foram utilizadas 51 amostras de efusões de pacientes que não estavam utilizando antibioticoterapia prévia. Dentre as 51 amostras, 25 foram efusões obtidas de cães, sendo 19 assépticas e 6 sépticas e 26 amostras de efusões obtidas de gatos, 17 efusões assépticas e 9 sépticas. A avaliação citológica dos líquidos cavitários abordou a contagem total de células nucleadas, quantificação de neutrófilos, porcentagem de neutrófilos íntegros, degenerados, hipersegmentados e avaliação de sua morfologia celular. A densidade, pH, mensuração de glicose, lactato e proteína total, também foram analisadas nas efusões. A identificação da espécie bacteriana foi realizada pela metodologia do Maldi - Tof. Adicionalmente, foi realizado hemograma dos pacientes incluídos no projeto. Proteína total foi quantificada no soro e glicose e lactato no plasma fluoretado. Nas efusões sépticas foi possível observar a presença de neutrófilos degenerados ($P < 0,001$), alterações de degeneração como picnose e cariólise em maior proporção, confirmando que a presença de neutrófilos degenerados tem correlação com a presença de bactérias nas efusões sépticas. Além de valores de glicose baixo e lactato elevado, foi possível a identificação bacteriana pelo método Maldi - Tof na maioria das amostras e *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e Enterobacter, foram as bactérias mais observadas nas efusões sépticas. Nos hemogramas dos pacientes com efusões sépticas foi possível observar presença de neutrófilos tóxicos (cães: $P = 0,025$; gatos: $P = 0,001$). A avaliação da morfologia dos neutrófilos e visualização alterações de degeneração celular nas análises citológicas dos líquidos cavitários, aliados a parâmetros bioquímicos como glicose e lactato e a utilização do Maldi - Tof, são ferramentas que podem facilitar a identificação de efusões sépticas em cães e gatos contribuindo para o diagnóstico, tratamento e sobrevida desses animais.

Palavras-chave: bactérias, cães, gatos, células, neutrófilos.

BIOCHEMICAL AND CYTOLOGICAL PARAMETERS ASSOCIATED WITH BACTERIAL IDENTIFICATION IN SEPTIC EFFUSIONS IN DOGS AND CATS

Author: Tânia Marta Ferraboli

Advisor: Stella de Faria Valle

ABSTRACT

Sensitive and specific diagnosis of septic effusions is becoming increasingly necessary in veterinary medicine, since the lethality rate of animals that present pyothorax or peritonitis is high. The cell found in greatest quantity in exudates is the neutrophil and cellular degeneration changes may be related to the presence of bacteria. The measurement of biochemical parameters such as glucose and lactate combined with confirmation of the presence of bacteria by simpler, faster and more sensitive methods can facilitate the identification of septic effusions. This study sought to associate the morphology of neutrophils with other cytological, biochemical parameters, bacteriological culture and identification using the Maldi-Tof methodology in cavity fluids from dogs and cats. 51 effusion samples from patients who were not using previous antibiotic therapy were analyzed. Among the 51 samples, 25 were effusions obtained from dogs, 19 of which were aseptic and 6 septic and 26 effusion samples obtained from cats, 17 aseptic effusions and 9 septic. The cytological evaluation of cavity fluids addressed the total cell count nucleated cells, quantification of neutrophils, percentage of intact, degenerated and hypersegmented neutrophils and evaluation of their cellular morphology. The density, pH, measurement of glucose, lactate and total protein were also analyzed in the effusions. The identification of the bacterial species was carried out using the Maldi - Tof methodology. Additionally, a complete blood count was performed on patients included in the project. Total protein was quantified in serum and glucose and lactate in fluoridated plasma. In septic effusions it was possible to observe the presence of degenerated neutrophils ($P < 0.001$), and degenerative changes such as pyknosis and karyolysis in a greater proportion, confirming that the presence of degenerated neutrophils has correlation with the presence of bacteria in septic effusions. In addition to low glucose values and high lactate, bacterial identification using the Maldi - Tof method was possible in most of the samples and *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Enterobacter* were the bacteria mostly observed in septic effusions. In blood counts of patients with septic effusions it was possible to observe the presence of toxic neutrophils (dogs: $P = 0.025$; cats: $P = 0.001$). A evaluation of neutrophil morphology and visualization of changes in cellular degeneration in cytological analyzes of cavity fluids, combined with biochemical parameters such as glucose and lactate and the use of Maldi - Tof, are tools that can facilitate the identification of septic effusions in dogs and cats contributing to diagnosis, treatment and survival of these animals.

Keywords: bacteria, dogs, cats, cells, neutrophils.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alterações morfológicas nos neutrófilos degenerados	37
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

C/T	Relação colesterol:triglicerídeos da efusão
CTCN	Contagem total de células nucleadas
CMP	Progenitor mielóide comum
CSF	Fator estimulante de colônias
FCoV	Coronavírus felino
fMLP	Peptídeo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos
GMP	Progenitor de granulócitos/monócitos/macrófago
IL	Interleucinas
LPS	Lipopolissacarídeo
LTs	Fatores de leucotrienos
Maldi-Tof	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight
PECAM-1	Adesão celular plaquetária
Phidro	Pressão hidrostática
PIF	Peritonite infecciosa felina
Ponco	Coloidosmótica ou oncótica
RNAr	Ácido ribonucleico ribossômico transportador
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
ITMs	Porções desencadeadoras da inflamação

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação das variáveis hematológicas de 25 cães com efusão séptica ou asséptica	39
Tabela 2 - Comparação de variáveis hematológicas de 26 gatos com efusão séptica ou asséptica	40
Tabela 3 - Variáveis bioquímicas séricas de 25 cães com efusão séptica ou asséptica	40
Tabela 4 - Variáveis bioquímicas séricas de 26 gatos com efusão séptica ou asséptica	41
Tabela 5 - Comparação de variáveis da análise das efusões cavitárias de cães com efusão séptica e asséptica (n= 25)	41
Tabela 6 - Comparação das variáveis da análise das efusões cavitárias de gatos com efusão séptica ou asséptica	42
Tabela 7 – Tipos de degenerações neutrofílicas observadas nas efusões sépticas de cães e gatos	42
Tabela 8 - Descrição da coloração de gram, cultura bacteriológica, identificação bacteriana por Maldi-Tof, local e etiologia das efusões sépticas dos cães	43
Tabela 9 - Descrição da coloração de gram, cultura bacteriológica, resultado do Maldi-Tof, local e etiologia das efusões sépticas dos gatos	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3.2.1 Transudação	17
3.2.2 Exsudação	18
3.2.3 Lactato e glicose	20
3.2.4 Condições específicas	21
3.2.4.1 <i>Rupturas ou vazamentos de órgãos, vísceras ou vasos sanguíneos</i>	21
3.2.4.2 <i>Efusões quilosas</i>	22
3.2.4.3 <i>Efusões hemorragias</i>	23
3.2.4.4 <i>Efusões neoplásicas</i>	23
3.3 FUNÇÃO, PRODUÇÃO E MATURAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS	24
3.3.1 Neutrófilos na circulação e no tecido	27
3.3.2 Morte dos neutrófilos	29
3.4 MALDI-TOF	30
4.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
REFERÊNCIAS GERAIS	33
ANEXOS	37

1. INTRODUÇÃO

As cavidades corporais abdominal, torácica e pericárdica, contém uma pequena quantidade de fluido, normal e necessário para permitir a livre movimentação interna dos órgãos; lubrificando, protegendo e diminuindo o atrito entre eles e entre as paredes das cavidades e estruturas ali presentes (Dempsey; Ewing, 2011; Alonso; Bulla; Paes, 2019; Oliveira, et al., 2021).

Porém, pode ocorrer um desequilíbrio gerado por causas etiológicas ou não, que alteram os mecanismos de produção, reabsorção e/ ou eliminação desses fluidos, resultando em seu acúmulo de forma anormal nas cavidades. Quando essa quantidade de fluido aumenta é denominada de efusão, líquido ou derrame cavitário (Dempsey; Ewing, 2011; Oliveira, et al., 2021).

As efusões são classificadas com base na quantidade celular, tipo celular, concentração de proteína, parâmetros bioquímicos e físicos. A avaliação e classificação dos líquidos cavitários se tornam mais urgentes ainda quando os fluidos têm envolvimento séptico (Stillion; Letendre, 2015; Martiny; Goggs, 2019). Bactérias, na maioria das vezes, são de difícil identificação nas efusões, devido a quantidade no líquido e/ou porque intervenções terapêuticas, como utilização de antibioticoterapia prévia, já foram realizadas (Stockham; Scott, 2011; Valenciano; Rizzi, 2020; Casna; Simmerson, 2021; Alonso; Christopher, 2021). O diagnóstico e tratamento precoce são essenciais para um prognóstico favorável nos animais que apresentam esse tipo de efusão (Stillion; Letendre, 2015; Martiny; Goggs, 2019).

A célula presente em maior quantidade nas efusões sépticas é o neutrófilo e a sua degeneração está relacionada à presença de bactérias (Brownlow 1983; Dempsey; Ewing, 2011; Alonso; Bulla; Paes, 2019; Alonso; Christopher; Paes, 2020 Oliveira, et al., 2021). Porém, não há estudos que comprovem essa relação, fato que facilitaria a determinação indireta e mais sensível da presença de bactérias nas efusões, relação que foi proposta neste estudo.

Parâmetros bioquímicos como a glicose e lactato das efusões também auxiliam na classificação das efusões sépticas (Stockham; Scott, 2011; Weiser, 2022; Boes, 2023). Nesses casos, a confirmação deve ser obtida através da cultura microbiológica do líquido cavitário. Atualmente, os métodos de cultura em nível de identificação de espécies utilizados, são demorados e por vezes pouco precisos. A espectrometria Maldi-Tof, permite uma identificação bacteriana rápida, fácil, mais sensível e de menor custo, encurtando o diagnóstico e tratamento

aumentando assim a sobrevida dos pacientes (Randall, et al., 2015; Marting; Goggs, 2019; Did, 2023).

Desta forma nos hipotetizamos que a degeneração dos neutrófilos tem associação com a presença de bactérias das efusões e que parâmetros bioquímicos como glicose, lactato, aliadas a uma identificação bacteriológica mais rápida podem facilitar a identificação de efusões sépticas em cães e gatos.

O propósito deste estudo foi associar a morfologia dos neutrófilos com os demais parâmetros citológicos, bioquímicos e a identificação bacteriológica pela metodologia do Maldi-Tof.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Associar a morfologia dos neutrófilos com os demais parâmetros citológicos, bioquímicos, cultura microbiológica e identificação pela metodologia do Maldi-Tof.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever os parâmetros citológicos, bioquímicos e séricos, das efusões cavitárias de cães e gatos
- Analisar a morfologia neutrofilica e associar com a presença de bactérias em efusões cavitárias de cães e gatos
- Analisar a glicose e o lactato da efusão e o soro dos animais com efusões sépticas e assépticas
- Identificar a espécie de bactéria em efusões sépticas de cães e gatos utilizando o método de Maldi-Tof.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.FISIOLOGIA DOS LÍQUIDOS NO ORGANISMO

A maior quantidade de líquido se encontra no espaço intracelular, seguido pelo espaço extracelular que corresponde ao meio extravascular (líquido intersticial) e o meio intravascular (plasma). O terceiro espaço que contém uma pequena quantidade de líquido é o meio transcelular, que corresponde aos líquidos presentes no pericárdico, intraocular, fluido cerebrospinal, sinovial, linfa, bile, secreções glandulares e secreções respiratórias (Dempsey; Ewing, 2011; Oliveira, et al., 2021).

Através dos capilares sanguíneos os líquidos compostos por nutrientes, proteínas e demais substâncias importantes e necessárias para irrigar e nutrir todas as estruturas do corpo são transportados ao longo do corpo. Esses capilares são formados por uma fina camada de endotélio capilar que permite através de seus poros a troca de nutrientes entre o tecido, interstício e o sangue circulante (Light; Macgregor, 1972; Valenciano; Rizzi, 2020; Boes, 2023).

A entrada e saída dos líquidos e/ou fluidos, são controladas pelas forças de Starling, que movimentam os líquidos corporais através de duas pressões. Uma delas é a pressão hidrostática (Phidro), que é a força exercida pelo volume de água dentro dos vasos sanguíneos nas paredes dos capilares empurrando o líquido para fora do vaso. A outra é a coloidosmótica ou oncótica (Ponco), que é força de atração gerada pelos solutos, principalmente a albumina (proteína que está em maior quantidade na circulação), que estão presentes nos vasos sanguíneos, atraindo o líquido para dentro dos vasos, reabsorção (Dempsey; Ewing, 2011; Oliveira, et al., 2021). Essas forças mantêm o equilíbrio determinando se o líquido é reabsorvido ou eliminado conforme a necessidade, processo que ocorre em condições fisiológicas impedindo que ele se acumule nas cavidades (Boes, 2023).

A Phidro sempre inicia maior e vai diminuindo ao longo do leito capilar e a Ponco sempre se mantém a mesma dentro do vaso, processo necessário para que ocorra a filtração no início do leito capilar e a absorção no final, assim o sangue chega, irriga os tecidos e no final retorna ao sistema circulatório (Dempsey; Ewing, 2011; Stockham; Scott, 2011; Stillion; Letendre, 2015).

É normal que permaneça uma pequena quantidade de líquido entre as cavidades, no espaço intersticial para lubrificar, nutrir e oferecer movimentação entre as estruturas ali presentes, impedindo o atrito entre as superfícies. Em condições fisiológicas, o fluido deve ser incolor ou discretamente amarelado, não apresentar eritrócitos e ter baixa quantidade de células nucleadas (Valenciano; Rizzi, 2020; Oliveira, et al., 2021).

O excesso do líquido e outras substâncias como moléculas grandes que não conseguem retornar para o sistema circulatório ou que não são necessários, são empurrados para fora do vaso através das forças hidrostáticas para o espaço intersticial e são reabsorvidos pelos vasos linfáticos que conduzem esse líquido em direção ao coração. Durante o percurso a linfa (nome que o líquido recebe assim que é captado pelos vasos linfáticos), passam pelos linfonodos antes de retornar a circulação (Valenciano; Rizzi, 2020; Boes, 2023).

Algumas etiologias ou condições podem interferir nesses mecanismos que regulam os líquidos, levando ao seu acúmulo anormal entre essas cavidades (Dempsey; Ewing, 2011). São diversas as causas que podem levar a esse acúmulo. Processos infecciosos, inflamatórios, neoplásicos, traumas, rupturas, hemorragias entre outras são causas conhecidas de formação anormal de líquidos. Esses processos patológicos alteram os mecanismos de fluidez dos líquidos, levando ao aumento da P_{hidro} nos vasos sanguíneos, queda na P_{onco} no plasma, obstruções nos vasos linfáticos e alteração na permeabilidade vascular (Casna; Simmerson, 2021; Oliveira, et al., 2021).

O aumento anormal de quantidade de líquido, que pode ser definido como efusão, líquido ou derrame cavitário (Dempsey; Ewing, 2011; Stockham; Scott, 2011; Stillion; Letendre, 2015; Oliveira, et al., 2021; Valenciano; Rizzi, 2020; Boes, 2023).

3.2 MECANISMOS DE FORMAÇÃO DAS EFUSÕES E SUAS CLASSIFICAÇÕES

As efusões podem ser formadas por mecanismos de transudação, exsudação ou rupturas/vazamentos nas vísceras ou vasos. O mecanismo de transudação ocorre quando há alteração nas leis de Starling, aumento da P_{hidro} e diminuição da P_{onco} ou alterações no sistema linfático. Já os líquidos formados por exsudação, ocorrem em resposta quimiotáticas, que altera os mecanismos de permeabilidade vascular e por fim o acúmulo anormal de líquido por rupturas ou vazamentos de vísceras, órgãos ou vasos sanguíneos (Dempsey; Ewing, 2011; Oliveira, et al., 2021). Este último no início pode se apresentar como um mecanismo de transudação e

posteriormente se apresentar como um mecanismo de exsudação pela atração das células inflamatórias (Valenciano; Rizzi, 2020; Oliveira, et al., 2021; Boes, 2023).

A classificação das efusões busca auxiliar na identificação do mecanismo pelo qual ela ocorreu, e posteriormente a causa que desencadeia esse desequilíbrio (Burton, 2018; Valenciano; Rizzi, 2020; Boes, 2023).

Com base em um conjunto de variáveis, anamnese, sinais clínicos, concentração de proteína e a contagem total de células nucleadas (CTCN), as efusões podem ser classificadas em transudato puro ou pobre em proteína, transudato modificado ou rico em proteínas, exsudato (asséptico ou séptico), e condições específicas tais como: rupturas ou vazamentos de órgãos, vísceras ou vasos sanguíneos, efusões quilosa, uroperitônio, neoplásica e hemorrágica (crônica e aguda) (Stockham; Scott, 2011; Dempsey; Ewing, 2011; Valenciano; Rizzi, 2020; Boes, 2023).

Esta classificação auxilia no entendimento do mecanismo que está sofrendo alteração em sua pressão e conseqüentemente facilita a compreensão da causa que está atrás desta alteração (Dempsey; Ewing, 2011; Boes, 2023).

3.2.1 Transudação

Os líquidos transudativos são resultado de alterações nas forças de Starling, que afetam as pressões P_{hidro} e/ou P_{onc} ou alterações no sistema linfático. Essas alterações ocorrem por distúrbios hipertensivos ou congestivos, como por exemplo a insuficiência renal, insuficiência cardíaca, hepatopatias, neoplasias e hipoalbuminemia; distúrbios que levam ao aumento do fluxo dos líquidos nos vasos sanguíneos e diminui a remoção dos mesmos pelos vasos linfáticos, fazendo com que se acumule na cavidade (Valenciano; Rizzi, 2020; Oliveira, et al., 2021).

As características dos derrames por transudação se apresentam conforme a origem do fluido, mas geralmente são líquidos que apresentam uma baixa quantidade de células inflamatórias pois a pouco estímulo para atraídas e a quantidade de proteína é variável, dependendo da etiologia envolvida e da cronicidade do líquido (Dempsey; Ewing, 2011).

Quando ocorre a diminuição da albumina principal soluto presente nos vasos sanguíneos, a força de Starling oncótica é alterada. A diminuição desta proteína pode ter diversas etiologias, as principais causas são por perdas renais e/ou gastrointestinais, má

absorção ou por causas primárias como deficiência nutricional e/ou insuficiência hepática. Como o principal soluto que regula a pressão oncótica está deficiente a reabsorção dos líquidos fica prejudicada e ele acaba se acumulando no interstício de forma anormal (Stockham; Scott, 2011; Oliveira, et al., 2021).

De acordo com suas características químicas, físicas e citológicas, os líquidos gerados pela essa deficiência de soluto devido as diversas causas citadas acima, geralmente apresenta baixa quantidade CTCN $< 1.500/\mu\text{L}$ e baixa quantidade de proteína $< 2,0 \text{ g/dL}$ e são classificados como transudados puros ou pobres em proteínas (Alonso; Bulla; Paes, 2019; Boes, 2023).

Já quando a Phidro sofre aumento, decorrente de congestão venosa no fígado ou nos pulmões o líquido acumulado nas cavidades apresenta uma contagem de células nucleadas $< 5.000/\mu\text{L}$ e proteína total $> 2 \text{ g/dL}$. São líquidos com um pouco de turbidez, fluidos, discretamente avermelhados e recebem a classificação de transudatos modificados ou ricos em proteína (Alonso; Bulla; Paes, 2019; Valenciano; Rizzi, 2020).

As células comumente observadas nos transudados puros ou pobres em proteínas e nos transudados modificados ou ricos em proteínas são células mesoteliais reativas, neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Valenciano; Rizzi, 2020). Entretanto, pode ocorrer uma transição devido a cronicidade do derrame de transudato puro para um trasudato modificado e caso persistir para um exsudato (Dempsey; Ewing, 2011; Boes, 2023).

Esse trânsito ocorre pois o acúmulo de líquido anormal nas cavidades é irritativo para as células mesoteliais que estão ali presentes e são reativas a este tipo de derrame e posteriormente, então sempre presentes nesses tipos de líquido. Após um tempo essas células acabam morrendo e liberando citocinas que atraem os macrófagos para remover os restos celulares, resultando em um leve aumento na contagem de células nucleadas e na proteína total e à medida que esse processo vai se tornando crônico mais contagem de células nucleadas, vai sendo atraída e a proteína aumentando e dificilmente será possível distinguir de transudado para exsudato (Boes, 2023).

3.2.2 Exsudação

Os líquidos formados pelo mecanismo de exsudação ocorre pelo aumento da permeabilidade vascular resultado de processos inflamatórios secundário a causas infecciosas

como bactérias, fungos, vírus, helmintos e protozoários ou causas não infecciosas que geram quadros inflamatórios intensos, como enterites, torções de órgãos, pancreatite, extravasamento de líquidos irritativos (urina, bile, esperma), neoplasias inflamatórias, dentre outras causas (Stockham; Scott, 2011; Oliveira, et al., 2021; Boes, 2023).

Os exsudatos apresentam diferentes colorações, variando de vermelho a amarelado, de aspecto turvo, com CTCN > 5.000/ uL, proteína total > 3,0 g/dL, com predominância de neutrófilos (aproximadamente 50%) (Dempsey; Ewing, 2011; Alonso; Bulla; Paes, 2019; Alonso; Christopher; Paes, 2020 Oliveira, et al., 2021).

Os exsudatos, são classificados como exsudatos sépticos quando causas infecciosas estão envolvidas e exsudatos assépticos quando não tem envolvimento infeccioso (Stockham; Scott, 2011; Valenciano; Rizzi, 2020; Boes, 2023).

De uma maneira geral, os neutrófilos migram para a efusão devido aos efeitos quimiotáticos (histamina, bradicinina e leucotrienos) que são liberados pelo tecido inflamado e que atraem essas células. Na citologia, os neutrófilos são avaliados quanto a sua integridade celular em neutrófilos íntegros, que são relacionados a irritação grave e neutrófilos degenerados que estão relacionados à presença de bactérias (Stockham; Scott, 2011; Burton, 2018; Valenciano; Rizzi, 2020; Alonso; Christopher, 2021; Boes, 2023). E mesmo que esses microrganismos não sejam observados no líquido, a cultura microbiológica deverá ser realizada para confirmação (Stockham; Scott, 2011; Burton, 2018; Valenciano; Rizzi, 2020; Alonso; Christopher, 2021; Boes, 2023).

Os exsudatos sépticos podem ser gerados em consequências de perfurações no trato gastrointestinal, penetrações por corpos estranhos, inflamações graves e até mesmo por sepse sistêmica (Valenciano; Rizzi, 2020). As bactérias mais comumente isoladas nas peritonites em cães e gatos são *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. (Casna; Simmeron, 2021; Boes, 2023).

As causas de piotórax na maioria das vezes é desconhecida, mas acredita-se que cavidade oral e o pulmão sejam as principais fontes bacterianas que levam a esse processo efusivo séptico. Além de causas iatrogênicas, perfurações por corpos estranhos, traumas, perfuração de esôfago, doenças sépticas como osteomielite, discoespondilite, migração parasitária, dentre outros, são as principais causas de piotórax (Stillion; Letendre, 2015; Jonhson; Epstein; Reagan, 2023; Boes, 2023).

Os principais agentes aeróbicos isolados são *Escherichia coli*, *Pasteurella* spp., *Actinomyces* spp., *Nocardia* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. Os agentes anaeróbicos incluem *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus anaerobius*,

Bacteroides spp., *Prevotella* spp. e *Porphyromonas* spp. que vai depender conforme a etiologia envolvida no processo séptico (Stillion; Letendre, 2015; Boes, 2023).

Os líquidos causados pelo coronavírus felino (FCoV) agente causador da peritonite infecciosa felina (PIF), também recebe uma classificação especial de peritonite infecciosa felina. Gerado pelo aumento da permeabilidade vascular, o líquido apresenta altas concentrações de proteína total > 4,5 g/dL e baixa CTCN < 5.000 uL, cor amarelo, aspecto turvo ou límpido e comumente são observados neutrófilos íntegros e macrófagos ativados, entretanto em algumas efusões pode ser observado predominância de linfócitos. Para auxiliar no diagnóstico dessa efusão, várias ferramentas são citadas como a avaliação da relação albumina/globulina no líquido, avaliação isolada da proteína total, determinação de gamaglobulina, teste de Rivalta, imunofluorescência, imunquímica do líquido, sendo os dois últimos considerados mais específicos (Valenciano; Rizzi, 2020; Oliveira, et al., 2021; Boes, 2023).

3.2.3 Lactato e glicose

O lactato é produzido em circunstâncias normais pelo organismo, sendo produto da glicólise, e as células do músculo esquelético, cérebro, medula renal e eritrócitos responsáveis pela maior parte da produção fisiológica. Todo o lactato é derivado do piruvato, que é gerado normalmente durante a glicólise. A quantidade pequena de lactato produzida fisiologicamente é metabolizada principalmente pelo fígado e pelos rins, que o converte de volta a lactato através da enzima lactato-desidrogenase (Levin, et al., 2004; Pang, Boysen 2007).

Processos inflamatórios mediados por bactérias, que realizam glicólise anaeróbia podem elevar a concentração de lactato no sangue e/ou aumentar também a concentração de lactato nos meios extravascular como nas efusões. Se uma condição de hiperlactatemia se instala e a produção de lactato segue elevada, uma acidose láctica pode eventualmente ocorrer, devido à redução de pH causada pela presença do lactato (Levin, et al., 2004; Pang, Boysen 2007).

Desta forma, os valores de lactato também podem ser utilizados como ferramenta para auxiliar na detecção de bactérias no líquido. A atividade do lactato nas efusões é maior quando comparadas aos valores séricos, isso se dá pelo ambiente anaeróbico que se forma. Também, pode ocorrer a produção de lactato através da glicólise neutrofílica e pela presença de

metabólitos bacterianos no líquido, se apresentando aumentado em efusões sépticas (Light; Macgregor, 1972; Boncznski, et al., 2003; Levin, 2004; Rosato; Anai; Santana, 2011).

Assim como a glicose do líquido, também pode ser utilizada e se apresenta com valores baixos quando mensurados em consequência da atividade metabólica aumentada (glicólise aumentada) dos neutrófilos e das bactérias presentes no líquido, ressaltando que a glicose também pode se apresentar baixa nas efusões neoplásica em consequência a alta atividade das células (Bonczynski, et al., 2003; Nestor; Mccullough; Schaeffer, 2004; Dempsey; Ewing, 2011).

3.2.4 Condições específicas

Algumas etiologias geram quadros diagnósticos característicos e recebem uma classificação especial (Stockham; Scott, 2011; Valenciano; Rizzi, 2020; Boes, 2023).

3.2.4.1 Rupturas ou vazamentos de órgãos, vísceras ou vasos sanguíneos

As rupturas ou vazamentos de órgão vasculares (fígados e baço), vísceras e vasos sanguíneos, geralmente na cavidade abdominal, provocam a alteração dos mecanismos de permeabilidade vascular, em decorrência da reação inflamatória intensa causada pelo conteúdo anormal dessas substâncias na cavidade abdominal (Valenciano; Rizzi, 2020; Boes, 2023).

Inicialmente esses líquidos podem apresentar uma baixa contagem de células nucleadas e proteína total pois o processo inflamatório está no início. À medida que o processo vai ficando crônico, as células são atraídas, levando ao aumento da CTCN e da proteína (Boes, 2023).

A ruptura da vesícula biliar ou do ducto biliar comum, pode ser gerado por traumas secundários ou diretos no sistema biliar, tais como formação de mucocele, colelitíase, dilatação gástrica e vólvulo, obstrução da via biliar. A coloração do líquido biliar pode variar de marrom, amarelado ou esverdeado e os valores de bilirrubina do líquido apresentam-se duas vezes superiores às concentrações séricas (Boes, 2023). Nesse caso, o líquido gera uma irritação desencadeando um processo inflamatório. As células observadas na maioria dos casos são

neutrófilos, macrófagos e linfócitos, podendo ser classificada como efusão biliar (Burton, 2018; Valenciano; Rizzi, 2020; Boes, 2023).

As efusões geradas pela ruptura das vias urinárias e o extravasamento da urina na cavidade peritoneal são causadas, na maioria das vezes, por causas secundárias como traumas contusos gerados por cateterismo ou palpação realizadas de forma inadequadas (Boes, 2023). Apresentam baixa concentração proteica devido a diluição e contagem celular variável, podendo ser assépticas ou sépticas (Valenciano; Rizzi, 2020). A célula mais observada neste tipo de efusão também é o neutrófilo e alterações de apoptose são geradas pela presença de microrganismos e pela irritação causada pela urina também podem ser observadas (picnose, cariorrexe e cariólise) (Boes, 2023).

No início da formação, a efusão pode ter características de transudato modificado, com a evolução e a irritação causada pelo extravasamento de líquido, ocorre a atração de células gerada pelos mediadores inflamatórios e observa-se uma grande quantidade de neutrófilos, linfócitos e macrófagos, podendo ser classificado como exsudato. Na suspeita de uoperitônio, recomenda-se a dosagem de creatinina do líquido que deve se apresentar duas vezes maior que a creatinina sérica do paciente (Stockham; Scott, 2011; Valenciano; Rizzi, 2020).

As rupturas gastrointestinais são decorrentes de torções, intussuscepção, inflamações graves, obstruções, traumas, dentre outras causas. Neutrófilos degenerados são comumente observados devido a presença de bactérias no líquido (Valenciano; Rizzi, 2020).

3.2.4.2 Efusões quilosas

. A efusão quilosa devido às suas características químicas, físicas e citológicas são facilmente reconhecidas, também recebem uma classificação especial, apesar de ser gerada pelo mesmo mecanismo dos transudatos modificados. Esse acúmulo de líquido pode ser observado quando ocorre obstrução dos vasos linfáticos (Stockham; Scott, 2011; Valenciano; Rizzi, 2020; Oliveira, et al., 2021).

Os vasos linfáticos assumem papel importante na drenagem do excesso dos líquidos no espaço intersticial, quando sofrem algum dano, seu trabalho fica prejudicado e o líquido é acumulado. O principal dano que impossibilita a drenagem através dos vasos linfáticos é a obstrução linfática, que pode ser consequência de um processo neoplásico, traumas, processos

infecciosos ou inflamatórios e por causas idiopáticas. São mais comuns nos gatos (Stockham; Scott, 2011; Valenciano; Rizzi, 2020).

Esse tipo de efusão tem característica leitosa, branca/opaca. Proteína total $> 2,0$ g/dL CTCN $< 10.000/\mu\text{L}$. As efusões quilosas apresentam alta concentração de triglicerídeos $> 3:1$, quando comparada a concentração sérica. Outros parâmetros também podem auxiliar na classificação da efusão quilosa como: relação colesterol:triglicerídeos da efusão (C/T) < 1 ou concentração de triglicerídeos > 100 mg/dL. Sendo que a efusão quilosa pode ser classificada também como transudato modificado ou exsudato devido à alta concentração de proteína e contagem celular (Bohn, 2017; Valenciano; Rizzi, 2020). Nas efusões quilosas a composição celular é basicamente composta de linfócitos em maior proporção (Stockham; Scott, 2011).

3.2.4.3 Efusões hemorragias

São causadas por distúrbios de coagulação, eventos traumáticos, neoplasias (cardíacas principalmente) ou intoxicação que causam um acúmulo de sangue nas cavidades. Esse tipo de efusão deve ser diferenciada de uma contaminação sanguínea e, para isso a união de informações, como exame físico, sinais clínicos, histórico e achados clínicos patológicos do líquido tais como a eritrofagocitose, presença de plaquetas e macrófagos fagocitando hemossiderina são fundamentais para a interpretação (Burton, 2018).

A efusão se apresenta geralmente na coloração vermelha, com proteína total $> 2,0$ g/dL e CTCN $> 2.000/\mu\text{L}$, dentre elas neutrófilos e macrófagos (Stockham; Scott, 2011; Boes, 2023).

3.2.4.4 Efusões neoplásicas

As efusões podem ser secundárias às neoplasias que se esfoliam células, o diagnóstico citológico poderá ser realizado. No entanto, a maioria dos tumores não esfoliam células e apresentam características de transudato modificado devido à alteração na Phidro e/ou Ponco, causadas pela obstrução dos vasos linfáticos provocados pelo crescimento e proliferação do tumor. Já as neoplasias que esfoliam células, apresentam características de exsudato, alta quantidade de células nucleadas e alta concentração de proteínas (Valenciano; Rizzi, 2020; Boes, 2023).

Algumas neoplasias esfoliam com mais facilidade tais como as epiteliais ou de células redondas sendo que as de origem mesenquimal, dificilmente esfoliam (Valenciano; Rizzi, 2020). As neoplasias podem gerar processos hemorrágicos, inflamatórios ou não. As mais comuns em cães e gatos são linfoma, adenocarcinoma ou carcinoma (Boes, 2023). Os sarcomas, também são mais relatadas, porém devido a origem mesenquimal, é de difícil esfoliação o que compromete a avaliação citológica. A visualização da massa e a biópsia citológica podem auxiliar nestes casos (Stockham; Scott, 2011).

As efusões neoplásicas se apresentam, na maioria das vezes, na coloração amarela ou laranja, clara ou turva, proteína total > 2,5g/dL, densidade > 1.017, a quantidade de leucócitos é variável e as células observadas, são células neoplásicas em maior proporção e podem ser observadas células do epitélio reativo, como neutrófilos, linfócitos e células mesoteliais (Valenciano; Rizzi, 2020; Boes, 2023).

3.3 FUNÇÃO, PRODUÇÃO E MATURAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS

São inúmeras as funções que o neutrófilo desempenha no organismo e é considerado uma célula essencial na homeostase imunológica (Hidalgo, et al., 2019). As principais funções do neutrófilo estão relacionadas a sua participação nas respostas inflamatórias do sistema imune inata e nas respostas adaptativas, no controle das inflamações, regulação de respostas celulares a fagocitose de estruturas estranhas e de microrganismos (Hidalgo, et al; 2019; Borregaard, 2010).

A medula óssea é o órgão hematopoiético onde ocorre a produção, diferenciação e renovação das células do sangue (Bongers, et al; 2021). Os neutrófilos em especial são produzidos quase exclusivamente na medula óssea dos animais adultos e saudáveis. Pode ser observada uma produção pequena nos órgãos considerados extramedulares como o baço, em animais jovens e em casos de aumento exagerado em processos inflamatórios e/ou devido alguma afecção, além do baço também pode ser observado alguma produção no fígado e nos linfonodos (Harvey, 2011; Weiser, 2022; Radin; Wellman, 2022).

As células progenitoras da linhagem mielóide, localizadas na medula óssea e nos tecidos extramedulares é quem gera os neutrófilos monócitos/macrófagos, eosinófilos e basófilos (Hidalgo, et al; 2019). A produção dos neutrófilos pode ter compreendida por fases a fase mitótica e a fase de maturação. Na fase mitótica as células primitivas possuem a capacidade de

se dividir, já na fase de maturação são observadas mudanças morfológicas de amadurecimento nuclear e a fase de armazenamento ou reserva, onde grande parte das células maduras são armazenadas parte na própria medula óssea e parte quando são liberados na corrente sanguínea, nos pequenos capilares ou na região marginal (Hidalgo, et al; 2019; Borregaard, 2010; Aroca-Crevillén, et al; 2024). Na circulação sua sobrevivência é de 8-12 horas, podendo circular em até 5 dias e no tecido de 1-2 dias (Radin; Wellman, 2022).

Ao longo do desenvolvimento dos neutrófilos, vários tipos de grânulos são produzidos de acordo com o estágio celular (Radin; Wellman, 2022). Nem todas as espécies animais possuem todos os tipos de grânulos e suas funções e desenvolvimento ainda estão sendo esclarecidas (Bongers, et al; 2021). O que se sabe é que o tipo de grânulo pode impactar na resposta do hospedeiro frente a patogenicidade dos microrganismos (Hidalgo, et al; 2019). São eles, os grânulos primários, secundários e terciários. Os grânulos primários são formados nos estágios de pró-mielócitos, secundários no estágio de mielócitos e metamielócitos e terciários no estágio de metamielócitos, bastonetes e neutrófilos segmentados. O grânulo primário é mieloperoxidase positiva e os demais peroxidase negativa (Radin; Wellman, 2022).

Essa variabilidade de grânulos ao longo do desenvolvimento do neutrófilo é necessária para auxiliar a célula a desempenhar suas funções. Parte dos grânulos são liberados no fagossomo da célula, ou membrana dos neutrófilos (primário) e parte do meio extracelular (secundário e terciário) e de forma inversa a sua produção (Hidalgo, et al; 2019). O primeiro grânulo a ser eliminado pelo neutrófilo é grânulo terciário, que tem como função auxiliar o neutrófilo em sua distribuição ao longo do organismo e migração nos tecidos, em seguida o grânulo secundário é liberado, esse tem como função auxiliar a célula a se infiltrar no tecido, além de possuir várias substâncias antimicrobianas que ajudam na destruição de patógenos. E por último o grânulo primário, que estimula o invasor a entrar no fagossomo do neutrófilo para posteriormente digerir e matar o agente (Bongers, et al; 2021; Radin; Wellman, 2022).

Os mieloblastos são as primeiras células da linhagem que podem ser distinguidas morfológicamente. Apresentam cromatina discretamente pontilhada, nucléolos moderadamente basofílicos, únicos ou múltiplos, com ausência de grânulos, denominados mieloblastos tipo I. A medida que amadurece, torna-se mieloblasto tipo II e é possível observar discreta quantidade de grânulos primários, denominados de azurófilos (mieloperoxidase positiva) (Hidalgo, et al; 2019; Aroca-Crevillén, et al; 2024).

Seguindo a fase mitótica, seguem os pró-mielócitos ou pro-granulócitos que apresentam diminuição da basofilia citoplasmática, e uma parte da área do Golgi pode se apresentar sem

grânulos. Apresentam cromatina discretamente pontilhada, nucléolos presentes ou ausentes, além de serem células maiores quando comparadas aos mieloblastos (Hidalgo, et al; 2019). Os mielócitos são as últimas células da fase de maturação ou divisão celular e apresentam-se com cromatina moderadamente condensada, núcleos redondos a ovais e citoplasma discretamente basofílica com grânulos secundários (peroxidase negativo), específicos de sua célula e origem, ou seja, neutrófilos, eosinófilo ou basófilo (Borregaard, 2010; Aroca-Crevillén, et al; 2024).

A partir dos metamielócitos e granulócitos bastonetes, não ocorre mais divisão celular, somente maturação. A cromatina sofre condensação e o núcleo se segmenta progressivamente. Os metamielócitos possuem núcleos alongados em formato de “grão de feijão”, já os granulócitos bastonetes, apresentam núcleo em formato de S ou U, com bordos nucleares lisos e com ambos os lados apresentando o mesmo tamanho e morfologia. Possuem citoplasma menor, basofílico e granular (Radin; Wellman, 2022).

Os neutrófilos maduros contêm vários pseudópodes que facilitam o contato com o receptor e a ativar sua função fagocítica (Radin; Wellman, 2022). Seu núcleo é composto por vários lóbulos (comumente é possível observar três a cinco bandas), possuem heterocromatina e eucromatina, discreta quantidade de poros nucleares e nucléolos muitas vezes não é observado (Hidalgo, et al; 2019; Aroca-Crevillén, et al; 2024). Quando maduro o núcleo pode produzir RNA e proteínas, necessários na formação da resposta inata gerada quando migra para os locais de inflamação, além disso possui também várias substâncias, como proteínas antimicrobianas que são utilizadas nos processos infecciosos (bactérias, fungos, protozoários e vírus), proteases e proteínas. Apresenta citoplasma com discreta quantidade de organelas e maior quantidade de glicogênio e grande quantidade de proteínas em seu citoesqueleto (Weiser, 2022; Radin; Wellman, 2022).

As interleucinas 3 (IL-3), a IL-6 e o fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), são os primeiros estimulantes que vão direcionado o progenitor mielóide comum (CMP) a se diferenciar em progenitor de granulócitos/monócitos/macrófago (GMP), que é responsável pela produção e proliferação dos neutrófilos e por fim, o maior estimulador de maturação funcional dos neutrófilos, o fator estimulante de colônias (CSF) (Hidalgo, et al; 2019; Weiser, 2022).

A maturação funcional dos neutrófilos é compreendida pelo aumento dos fatores de adesão, atividade quimiotática, produção de fatores bactericidas e fagocitose. Para isso, é necessário ocorrer alterações nas expressões da superfície celular para que o neutrófilo consiga realizar suas funções (Weiser, 2022). São várias as expressões de superfície, dentre eles a

expressão de CD29 e CD31, que são moléculas responsáveis pela adesão celular plaquetária (PECAM-1), CD33, CD49d, molécula de adesão celular vascular (VCAM), CD11b, CD11c, que são responsáveis pelo rolamento e adesão do neutrófilo (Radin; Wellman, 2022; Aroca-Crevillén, et al; 2024).

Após sua maturação, uma porcentagem dos neutrófilos são armazenados na própria medula óssea e os demais seguem para a circulação (compartimento circular) onde percorrem os grandes vasos, uma pequena porção é armazenado nos pequenos vasos sanguíneos, capilares (compartimento marginal) e alguns migram e seguem para os tecidos. Na circulação sua sobrevivência é de 8-12 horas, podendo circular em até 5 dias e no tecido de 1-2 dias (Aroca-Crevillén, et al; 2024).

Os neutrófilos são produzidos à medida que são consumidos sempre de forma ordenada. Sua produção e regulação é coordenada por um conjunto de citocinas e fatores de crescimento, dentre elas os chamados porções desencadeadoras da inflamação (ITMs); compreendidos e complexos, que são originados principalmente dos fibroblastos, endotélio e células mononucleares, ativam a inflamação e recrutam os neutrófilos (Borregaard, 2010; Weiser, 2022).

3.3.1 Neutrófilos na circulação e no tecido

Em condições normais a medula óssea de cães e gatos leva aproximadamente 6 dias da fase de mieloblasto a neutrófilo segmentado, sendo repostos na circulação à medida que são consumidos (Weiser, 2022). Quando são esgotados, nos cães, ocorre leucocitose em resposta a liberação de substâncias inflamatórias, e na medula óssea ocorre uma hiperplasia granulocítica, mediada pelo aumento na produção de CSF, que é responsável por mobilizar os neutrófilos das reservas na medula óssea, reduzindo a produção de 6 para 2 a 3 dias, e quando essa produção aumenta alterações morfológicas podem ser observados nos neutrófilos (Harvey, 2011; Hidalgo, et al; 2019; Bongers, et al; 2021; Weiser, 2022; Radin; Wellman, 2022).

Na circulação pode-se observar diferentes tipos de respostas leucocitárias, que variam conforme o estímulo e intensidade da inflamação/ infecção (Stockham, Scott, 2011). Em condições normais, a quantidade de células maduras será maior quando comparadas às células imaturas (metamielócitos e neutrófilos bastonetes). Quando a intensidade da inflamação é acentuada as células imaturas e com resquícios de citoplasma e organelas podem ser observadas

na circulação, tais como metamielócitos, neutrófilos bastonetes e neutrófilos tóxicos (Stockham, Scott, 2011; Radin; Wellman, 2022; Weiser, 2022).

Neutrófilos tóxicos, são células com resquícios de organelas devido à alta demanda de produção na medula óssea. Algumas alterações morfológicas podem ser observadas como corpúsculos de Döhle, vacuolização citoplasmática e basofilia citoplasmática. Alterações que não diminuem nem prejudicam a função dos neutrófilos (Stockham, Scott, 2011; Radin; Wellman, 2022; Weiser, 2022). Harvey (2011), sugere uma classificação em cruces (+) ou porcentagem (%) para essas células quando são encontradas na circulação. Ressaltando que corpúsculos de Döhle, podem estar presentes em uma quantidade pequena em gatos saudáveis.

Harvey (2011), propõe uma classificação de porcentagem (%) para determinar o grau de toxicidade dos neutrófilos nos esfregaços sanguíneos e em cruces (+) para qualificar a intensidade da toxicidade dos neutrófilos nos esfregaços sanguíneos. Em relação a porcentagem, discreta quantidade quando são observadas de 5% a 10% de neutrófilos tóxicos, moderado de 11% a 30% e acentuada acima de 30%. Em relação a classificação em cruces; a presença de corpúsculos de Döhle é classificado como 1+; citoplasma levemente basofílico 1+; citoplasma moderadamente basofílico com corpos de Döhle 2+; citoplasma moderadamente basofílico e espumoso 2+; citoplasma azul acinzentado escuro e espumoso 3+; citoplasma basofílico com grânulos tóxicos 3+.

Quando a demanda é no tecido os neutrófilos saem do sangue principalmente através das vênulas pós capilares, pela interação dos seus receptores com o endotélio durante o processo inflamatório, se fixam no endotélio, as quimosinas ativam seu movimento e as integrinas fornecem uma boa adesão e fixação aos neutrófilos, que seguem rolando até o tecido inflamado ou infectado (Aroca-Crevillén, et al; 2024; Weiser, 2022).

Esse processo de fixação e rolagem no endotélio até chegar ao tecido atingido, atrai e libera várias citocinas que recrutam outros leucócitos, como macrófagos, células natural killer e linfócitos, que também modulam participam do processo inflamatório. Ao chegar no tecido os neutrófilos são atraídos pelos quimiotáticos liberados pelo tecido e pelo patógeno, direcionando a neutrófilo para o alvo ou processo a ser controlado (Hidalgo, et al; 2019; Aroca-Crevillén, et al; 2024). Dentre eles, podemos citar os peptídeo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), os componentes complementares (C5a e C3a), IL-8 e os fatores de leucotrienos (LTs) (Hidalgo, et al; 2019; Bongers, et al; 2021; Weiser, 2022).

Quando o neutrófilo localiza o patógeno, outras substâncias e citocinas ativam a função fagocitose, dentre elas os ROS, lipopolissacarídeo (LPS), fator de necrose tumoral alfa (TNF-

α) e através de seus receptores presentes em suas superfícies celular e intracelular permite que a célula endocite o patógeno e elimine o patógeno (Teng, 2017; Hidalgo, et al; 2019; Bongers, et al; 2021).

Dentro do fagossoma do neutrófilo existem várias substâncias que matam o patógeno e outras como o sistema NADPH oxidase, que fornece um ambiente adequado para que ocorra uma a digestão celular do patógeno. E várias substâncias que matam/digerem os patógenos intra e extracelular, elas são dependentes e independentes de oxigênio, dentre elas as proteínas antibacterianas, como os peptídeos, defensinas e catelicidina componentes dos grânulos primários e liberados pelos neutrófilos, dentre outras (Teng, 2017; Hidalgo, et al; 2019).

Formando um complexo mecanismo chamado explosão respiratória, assim que o patógeno vai sendo destruído o neutrófilo também sofre morte por apoptose, formando os chamados corpos apoptóticos, que posteriormente são fagocitados pelos macrófagos (Bongers, et al; 2021; Radin; Wellman, 2022).

Entretanto alguns agentes etiológicos conseguem barrar esse mecanismo de defesa e se disseminam no organismo gerando quadros inflamatórios/infecciosos intensos e muitas vezes levando o animal ao óbito (Teng, 2017; Radin; Wellman, 2022).

3.3.2 Morte dos neutrófilos

Os neutrófilos podem morrer por apoptose ou necrose. A forma como o neutrófilo morre depender da intensidade do estímulo por ele recebido através das porções desencadeadoras da inflamação (ITMs), dentre elas os lipopolissacarídeos bacterianos, nucleotídeos extracelulares, ativam a inflamação e recrutam os neutrófilos. Assim que a inflamação é resolvida os neutrófilos presentes no local fagocitam e desativam essas ITMs e morrem por apoptose. Porém se o processo inflamatório se intensifica e/ou permanece, as ITMs aumentam e consequentemente mais neutrófilos se acumulam no local e assumem outra forma de morte, a necrose (Presbitero, et al., 2019).

A apoptose é a morte celular natural e necessária para manter a homeostase no organismo, além de eliminar as células defeituosas e regular os processos inflamatórios através da liberação de mediadores anti-inflamatórios. Esses processos de apoptose espontânea é conduzido pela diminuição da resposta função celular, antimicrobiana e pró-inflamatória dos neutrófilos, ou seja, das citocinas liberadas durante o processo inflamatório, o que é positivo

pois a liberação desse conteúdo carregado de substâncias, lesiona e prejudica ao tecido. Os restos celulares chamados de corpos apoptóticos que posteriormente são eliminados pelos macrófagos, dificilmente são observados na microscopia (Kobayashi; Malachowa; DeLeo, 2017; Radin; Wellman, 2022).

A necrose é a morte rápida da célula, que leva a alterações celulares que podem ser observadas diferentes da apoptose, como condensação de cromatina, fragmentação, inchaço da célula e das organelas, resultando na ruptura da membrana plasmática e extravasamento do seu conteúdo extracelular, mediadores e citocinas pró-inflamatórias que induzem a inflamação recrutando mais células para o local de inflamação (Presbitero, et al., 2019). Entretanto, a liberação dessas citocinas lesiona o tecido e pode desencadear um processo inflamatório mais intenso ainda e levar o paciente a sepse (Zachary, 2013; Kobayashi; Malachowa; DeLeo, 2017). Ainda não se sabe como a necrose é resolvida (Presbitero, et al., 2019).

Além dos processos inflamatórios intensos a hipóxia e as bactérias através da liberação de suas toxinas, dentre elas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* e a *Streptococcus aureus*, também induzem o neutrófilo a morte necrose (Urbano; Lourido; Zychinsky, 2006; Presbitero, et al., 2019).

3.4 MALDI-TOF

O termo Maldi-Tof que significa Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight refere-se a um método de identificação bacteriana que é utilizado há muito tempo na medicina humana. Tem mostrado ótimos resultados de forma simples, rápida, sensível e barata, apesar do custo inicial ser alto; quando comparados com as técnicas tradicionais de identificação a nível de gênero e espécie bacteriana, porém na medicina veterinária ainda pouco utilizado (Randall et al., 2015; Dib, 2023). Essa metodologia tem como base avaliar as proteínas ribossomais baseadas em seu tempo de voo, que é encontrada em maior abundância nos microrganismos, possibilitando a identificação de bactérias, leveduras e fungos das amostras. Amostras com um certo grau de contaminação podem prejudicar a identificação, então o pré-preparo com amostras puras é aconselhado (Randall et al., 2015; Daltonics, 2015).

Na prática, após o isolamento da cultura, ela é colocada em uma placa que contém uma matriz química, que penetra na parede celular, facilita a exposição das proteínas da amostra permitindo que ela seja analisada e transformada em sua forma gasosa, em seguida é disparado

um laser pelo equipamento, ocorre a vaporização da amostra, e as proteínas são captadas pelo detector (time off light – TOF) e comparadas com o banco de dados do equipamento. Esse tempo que a proteína demora para chegar até o detector gera um gráfico que é específico para cada tipo de bactéria, fungo ou levedura. Baseado nesse gráfico, uma base de dados contida no aparelho analisa e gera os resultados (Randall et al., 2015; Daltonics, 2015; Dib, 2023).

Os dados inseridos no banco de dados do aparelho são principalmente de humanos, entretanto essa metodologia demonstrou resultados satisfatórios e que podem ser utilizados na identificação dos patógenos veterinários (Randall et al., 2015; Dib, 2023).

4.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização do estudo pode-se observar que avaliação da morfologia dos neutrófilos, coloração de gram, mensuração da glicose e do lactato aliadas a identificação bacteriana pelo Maldi- Tof, facilitam a identificação mais rápida e sensível das efusões sépticas nos cães e gatos, contribuindo para o diagnóstico, tratamento e sobrevida desses animais.

REFERÊNCIAS GERAIS

ALONSO, F. H.; BULLA, C.; PAES, P. R. O. Canine cavity effusion: a retrospective study of 304 cases in Brazil. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 71, n. 3, p. 869–877, 2019.

ALONSO, F. H.; CHRISTOPHER, M. M.; PAES, P. R. O. The predominance and diagnostic value of neutrophils in differentiating transudates and exudates in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 50, p. 384-393, 2021.

AROCA-CREVILLÉN A; VICANOLO, T.; OVADIA, S.; HIDALGO, A. Neutrophils in physiology and pathology. **Annual review of pathology**, v. 19, n. 1, p. 227–259, 2024.

AUMANN, M.; WORTH, L. T.; DROBATZ, K. J. Uroperitoneum in cats: 26 cases (1986-1995). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 34, n. 4, p. 315–324, 1998.

BOES, K. M. Body Cavity Fluids. In: RASKIN, R.; MEYER, D. J.; BOES, K. M. **Canine and Feline Cytology A Color Atlas and Interpretation Guide**. 4. Ed. Elsevier. 2023, Cap. 6, p. 2023.

BOHN, A. A. Analysis of canine peritoneal fluid analysis. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 47, n. 1, p. 123–133, 2017.

BONCZYNSKI, J. J. *et al.* Comparison of peritoneal fluid and peripheral blood pH, bicarbonate, glucose, and lactate concentration as a diagnostic tool for septic peritonitis in dogs and cats. **Veterinary surgery: VS**, v. 32, n. 2, p. 161–166, 2003.

BONGERS, S. H. *et al.* Kinetics of neutrophil subsets in acute, subacute, and chronic inflammation. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 674079, 2021.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657–670, 2010.

BROWNLOW, M. A. Polymorphonuclear neutrophil leucocytes of peritoneal fluid. **Equine veterinary journal**, v. 15, n. 1, p. 22–24, 1983.

BURTON, A. G. Body Cavity Fluids. In: _____ **Clinical Atlas of Small Animal Cytology**. 1 ed. 2018. Cap. 5. Wiley Blackwell, p. 155-157.

CASNA, B. R.; SIMMERSON, S. M.; SUBASHCHANDRABOSE, S. Feasibility study evaluating a veterinary point-of-care urine culture system for diagnosing septic peritonitis. **Journal of veterinary emergency and critical care (San Antonio, Tex.: 2001)**, v. 31, n. 5, p. 595–600, 2021.

CHUSRI, S. *et al.* Clinical Outcomes of Hospital-Acquired Infection with *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 4172–4179, 2014.

CLSI M85 MALDI-TOF. Methods for the identification of cultured Microorganisms Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 1ed, p. 92, 2017.

CULP, W. T. N.; HOLT, D. E. **Septic Peritonitis**. Compendium: Continuing Education for Veterinarians, 2010.

DALTONICS, I. B. MALDI Biotyper 4.0 User Manual Revision B. MARTINY, P.; GOGGS, R. Biomarker Guided Diagnosis of Septic Peritonitis in Dogs. **Frontiers in Veterinary Science**. V. 6, 2015.

DEMPSEY, S. M.; EWING, P. J. A review of the pathophysiology, classification, and analysis of canine and feline cavity effusions. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 47, n. 1, p. 1–11, 2011.

DIB, C. Utilização do MALDI-TOF MS para identificação de micobactérias em amostras clínicas de animais. **PubVet**, v. 17, n. 07, p. e1414, 2023.

HARVEY, J. W. Hematopoiesis. In: _____ **Veterinary hematology: A diagnostic guide and color atlas Hematopoiesis**. 1 Ed. Elsevier. 2011. Cap. 5.

HIDALGO, A. et al. The neutrophil life cycle. **Trends in immunology**, v. 40, n. 7, p. 584–597, 2019.

JONHSON, L. R., EPSTEIN, S., REAGAN, K. L. Etiology and effusion characteristics in 29 cats and 60 dogs with pyothorax (2010-2020). **Journal of veterinary internal medicine**, 2023.

KOBAYASHI, S. D.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Influence of microbes on neutrophil life and death. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, 2017.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. Respostas celulares ao estresse e aos estímulos tóxicos: adaptações, lesão e morte. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Patologia bases patológicas das doenças**. 8 Ed. Elsevier. 2010. Cap. 1.

LEVIN, G.M. et al. Lactate as a diagnostic test for septic peritoneal effusion in dogs and cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v,40, p.364-371, 2004.

LEONG, L. E. X. et al. Burkholderia lata infections from intrinsically contaminated chlorhexidine mouthwash, Australia, 2016. **Emerging infectious diseases**, v. 24, n. 11, p. 2109–2111, 2018.

LIGHT, R. W; MACGREGOR, I. M. D. **Pleural Effusions: The Diagnostic Separation of Transudates and Exudates**. 1972.

MARTINY, P.; GOGGS, R. Biomarker guided diagnosis of septic peritonitis in dogs. **Frontiers in veterinary science**, v. 6, p. 1-13, 2019.

MOXLEY, R. Family Enterobacteriaceae. In: MCVEY, D.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M.; WILKES, R. **Veterinary Microbiology**. 2022. Cap. 5, 4 Ed. Willey.

MYERS, R. K.; MCGAVIN, D.; ZACHARY, J. F. Adaptations, injuries and cell death. In: ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. **Pathologic basis of veterinary disease expert consult**. 6 Ed. Elsevier. 2017. Cap. 1.

NARAYANAN, S. Pseudomonas. In: MCVEY, D.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. **Microbiologia veterinária**. 2013. Cap. 19, 3 Ed. Guanabara Koogan.

NESTOR, D. D.; MCCULLOUGH, S. M.; SCHAEFFER, D. J. Biochemical analysis of neoplastic versus nonneoplastic abdominal effusions in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, n. 5, p. 372–375, 2004.

OLIVEIRA, D. A. *et al.* Retrospective study of the aetiopathological diagnosis of pleural or peritoneal effusion exams of dogs and cats. **Comparative clinical pathology**, v. 30, n. 5, p. 811–820, 2021.

PANG, D. S.; BOYSEN, S. Lactate in veterinary critical care: Pathophysiology and management. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 43, n. 5, p. 270–279, 2007.

PAVLOVIC, M. *et al.* MALDI-TOF MS based identification of food-borne yeast isolates. **Journal of microbiological methods**, v. 106, p. 123–128, 2014.

PRESBITERO, A. *et al.* Game of neutrophils: modeling the balance between apoptosis and necrosis. **BMC bioinformatics**, v. 20, n. Suppl 6, p. 475, 2019.

RADIN, M. J.; WELLMAN, M. L. Granulopoiesis. In: BROOKS, M. B., *et al.* **Schalm's Veterinary hematology**. 7 ed. 2022. Cap. 41. Wiley Blackwell.

RANDALL, L. P. *et al.* Evaluation of MALDI-ToF as a method for the identification of bacteria in the veterinary diagnostic laboratory. **Research in veterinary science**, v. 101, p. 42–49, 2015.

ROSAS, B.; Y.; MUÑOZ, O., K.; GARCÍA, O., T. Pseudomonas aeruginosa: an emerging nosocomial trouble in veterinary. **Revista MVZ Cordoba**, v. 20, n. supl, p. 4937–4946, 2015.

ROSATO, P. N.; ANAI, L. A.; SANTANA, A. E. Correlação da atividade de lactato desidrogenase e concentração de lactato com a classificação de efusões em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.9, p.1582-1586, set, 2011.

STEWART, G. Staphylococcus. In: MCVEY, D.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M.; WILKES, R. **Veterinary Microbiology**. 2022. Cap. 25, 4 Ed. Willey.

STEWART, G. Streptococcus and enterococcus. In: MCVEY, D.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M.; WILKES, R. **Veterinary Microbiology**. 2022. Cap. 26, 4 Ed. Willey.

STILLION, J. R.; LETENDRE, J.-A. A clinical review of the pathophysiology, diagnosis, and treatment of pyothorax in dogs and cats. **Journal of veterinary emergency and critical care**, v. 25, n. 1, p. 113–129, 2015.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Cavitory effusions. In: _____ **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. 2. Ed. Guanabara Koogan. 2011. Cap. 19, p. 831-867.

SWANN, H.; HUGHES, D. Use of abdominal fluid pH, pO₂, glucose, and lactate to differentiate bacterial peritonitis from non-bacterial causes of abdominal effusion in dogs and cats. **Proceed International Veterinary Emergency and Critical Care Society meeting**, 1996:884.

TENG, T.-S. et al. Neutrophils and immunity: From bactericidal action to being conquered. **Journal of immunology research**, v. 2017, p. 1–14, 2017.

URBAN, C. F.; LOURIDO, S.; ZYCHLINSKY, A. How do microbes evade neutrophil killing? **Cellular microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1687–1696, 2006.

VALENCIANO, A. C; RIZZI, T. E. Abdominal, Thoracic, and Pericardial Effusions. In: VALENCIANO, A. C.; COWELL, R. L. **Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat**. 5. Ed. Elsevier. 2020. Cap. 15, pg. 229-231.

WEISER, G. Introduction to Leukocytes and the Leukogram. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Veterinary hematology clinical chemistry and cytology**. 2022. Cap. 2, seção 11. 3 Ed. Willey Blackwell.

ZACHARY, J. F. Mecanismo das infecções microbianas. In: ZACHARY, J.; MCFAVIN, M. D. **Bases da patologia em veterinária**. Ed. 5 Elsevier. 2013. Cap. 07,

ANEXOS

ANEXO A: Questionário entregue aos médicos veterinários



CORRELAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E CITOLÓGICOS COM A CULTURA E A IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA EM EFUSÕES CAVITÁRIAS EM CÃES



Questionário

PACIENTE (nome e cód): _____

TUTOR: _____

Obs: Coloque um no quadrante se o paciente atende aos requisitos do projeto.

Pré requisitos

- Cão ou gato
- Efusão: abdômen tórax
- Ausência de tratamento com antibiótico
- Forma de coleta:
 - Torneira de 3 vias/scalp
 - Outra: _____
- Quantidade de amostra de **EFUSÃO**:
 - Tubo de edta (roxo) **2mL**
 - Tubo seco (vermelho) **3mL**
- Amostra sérica do **PACIENTE**
 - Tubo edta (roxo) *
 - Tubo seco (amarelo ou vermelho) **2mL**
 - Fluoreto de sódio* (cinza)

***Volume adequado segundo o fabricante do tubo.**

Benefícios (sem custo)

- Hemograma (**prazo 24hrs úteis**).
- Análise da efusão cavitária (**prazo 72hrs úteis**).
- Cultura da amostra (**prazo 7 dias**).

Onde buscar os exames:

- Hemograma e análise da efusão (SimplesVet)
- Cultura bacteriológica (SimplesVet)

Nome e assinatura do médico veterinário responsável pelo paciente:
