



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE FATORES ESTIMULADORES DE
COLÓNIAS DE GRANULÓCITOS NO MANEIO DE DOENÇAS ASSOCIADAS A
NEUTROPÉNIA EM CÃES E GATOS: ESTUDO RETROSPETIVO DE 30 CASOS
CLÍNICOS (2011 – 2016)

ANA CRISTINA MARTINS DA VIOLANTE

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Manuela Grave Rodeia

Espada Niza

Doutora Solange Judite Roque Coelho

Alves Gil

Dr. Luís Miguel Amaral Cruz

ORIENTADOR

Dr. Luís Miguel Amaral Cruz

CO-ORIENTADORA

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira

São Braz

2016

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE FATORES ESTIMULADORES DE
COLÓNIAS DE GRANULÓCITOS NO MANEIO DE DOENÇAS ASSOCIADAS A
NEUTROPÉNIA EM CÃES E GATOS: ESTUDO RETROSPETIVO DE 30 CASOS
CLÍNICOS (2011 – 2016)

ANA CRISTINA MARTINS DA VIOLANTE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Manuela Grave Rodeia

Espada Niza

Doutora Solange Judite Roque Coelho

Alves Gil

Dr. Luís Miguel Amaral Cruz

ORIENTADOR

Dr. Luís Miguel Amaral Cruz

CO-ORIENTADORA

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira

São Braz

2016

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, o Dr. Luís Cruz por ter aceitado orientar a minha tese, mas também pelo seu enorme contributo na minha formação através da partilha dos seus vastos conhecimentos, por acreditar nos estagiários e nos incentivar a procurar saber cada vez mais. Agradeço também à Dra. Ana Maldonado pela oportunidade de estagiar no Hospital Veterinário das Laranjeiras.

À minha co-orientadora, a professora Dra. Berta São Braz pela sua enorme disponibilidade, ajuda e simpatia tanto na realização desta dissertação, como ao longo do curso.

Ao resto do corpo clínico do HVL agradeço por me terem acolhido tão bem na vossa equipa que, mais que isso, é uma família; obrigada por tudo o que me ensinaram, pelo ambiente de boa disposição e companheirismo, a motivação e o apoio: “Becas” Gomes, Débora Pereira, Francisco Silva, Hugo Lopes, Ivana Coimbra, Juliana Pereira, Liliana Rua, Marta Maia, Marta Ribeiro e Mónica Silvério.

Aos meus colegas de estágio, sem os quais os meses no HVL não teriam sido os mesmos: Fábio Cunha, Rita Baltazar, Rita Cardoso e Sara Lisboa.

À Ana Marques, que é a prova que há pessoas que rapidamente conquistam um espacinho no nosso coração. Tornaste-te numa amiga muito especial e só te posso agradecer o apoio incansável que me tens dado.

Às minhas amigas da faculdade, as meninas da segunda fila, Anabela Martins, Andreia Jacinto, Beatriz Santos e Joana Silva, que me acompanham desde o início. Obrigada por todos os momentos de amizade, ajuda e até de estudo (sempre com muitos risos) que partilhámos ao longo destes anos. Tornaram o meu percurso na FMV numa experiência ainda mais incrível.

Aos meus pais e ao meu irmão agradeço a força e o apoio que sempre me deram. Nunca duvidaram que eu era capaz e estiveram sempre disponíveis para me motivar e fazer chegar mais longe.

Aos meus gatos “Leo” e “Mickey” por todos os momentos em que me fizeram companhia, perturbaram o meu estudo e terem sido, muitas vezes, cobaias na minha aprendizagem.

RESUMO

Contribuição para o estudo da utilização de fatores estimuladores de colónias de granulócitos no manejo de doenças associadas a neutropénia em cães e gatos: estudo retrospectivo de 30 casos clínicos (2011 – 2016)

A neutropénia é um achado hematológico que se encontra associado a várias afeções no cão e no gato e, ao ser responsável pelo estabelecimento de um estado de imunossupressão, contribui de modo significativo para o agravamento da morbidade e mortalidade dos doentes. No sentido de reverter a neutropénia e prevenir as suas consequências, podem ser administrados fatores estimuladores de colónias de granulócitos recombinantes humanos (rhG-CSF) que aceleram a produção e diferenciação dos neutrófilos na medula óssea e causam a sua saída para o sangue. Assim, esta dissertação teve como objetivo avaliar retrospectivamente a utilização de rhG-CSF em várias doenças em canídeos e felídeos, de modo a contribuir para um maior conhecimento do seu uso em medicina veterinária.

Neste estudo, os rhG-CSF foram administrados a animais com neutropénia induzida pela infeção por parvovírus canino e felino (60,0%), por fármacos citotóxicos (20,0%) e hipoplasia da medula óssea (20,0%). A maioria destes animais apresentou-se com neutropénia grave (46,7%), seguida de neutropénia moderada (33,3%) e ligeira (20,0%).

A utilização dos rhG-CSF foi avaliada através de hemogramas realizados antes da primeira administração e após 48 horas. Em todos os grupos foram encontrados aumentos significativos nas contagens absolutas dos leucócitos totais e neutrófilos. No grupo amostral de animais com infeção por parvovírus foi também observado um aumento significativo no número de monócitos, linfócitos e eosinófilos. Uma diminuição na contagem dos eritrócitos foi ainda encontrada no grupo de animais com infeção por parvovírus e mielotoxicidade secundária a fármacos citotóxicos, mas o seu significado é questionável.

Como segunda parte deste estudo foi feita uma análise individual dos casos clínicos, na qual se verificou que a taxa de resposta aos rhG-CSF foi de 73,3%. Para além disto, foi ainda investigada a existência de associação entre a taxa de resposta e outras variáveis registadas, tendo-se encontrado uma associação com a etiologia ($p = 0,041$) e o desfecho clínico, classificado como alta médica ou óbito ($p = 0,001$).

Apesar do pequeno tamanho da amostra estudada, os resultados da presente dissertação sugerem que a utilização de rhG-CSF em cães e gatos apresenta efeitos terapêuticos benéficos a nível hematológico, sendo bem tolerados quando administrados em protocolos de curta duração.

Palavras-chave: cão, gato, neutropénia, fatores estimuladores de colónias de granulócitos, filgrastim, lenograstim.

ABSTRACT

Contribution to the study of the use of granulocyte colony-stimulating factors in the management of diseases associated with neutropenia in dogs and cats: retrospective study of 30 clinical cases (2011 – 2016)

Neutropenia is a hematological finding that can be caused by a diversity of diseases in dogs and cats and, by being responsible for an immunocompromised state, contributes significantly to patient morbidity and mortality. In order to reverse neutropenia and prevent its consequences, human recombinant granulocyte colony-stimulating factors (rhG-CSF) can be used, which are drugs that increase neutrophil production and differentiation in the bone marrow and their release into the blood. The aim of this dissertation was to retrospectively evaluate the use of rhG-CSF in various clinical conditions in canine and feline patients, contributing to a greater knowledge of their use in veterinary medicine.

In this study rhG-CSF were administered to animals with neutropenia induced by canine and feline parvovirus infection (60,0%), by cytotoxic drugs (20,0%) and bone marrow hypoplasia (20,0%). The majority of these animals presented with severe neutropenia (46,7%), followed by moderate (33,3%) and mild neutropenia (20,0%).

The use of these drugs was evaluated through complete blood counts performed before the first administration and after 48 hours. In all groups significant increases on total leukocyte and neutrophil counts were observed. In the sample group of animals with parvovirus infection a significant increase in the number of monocytes, lymphocytes and eosinophils was also found. A decrease in the number of erythrocytes was also seen in the group of animals with parvovirus infection and myelotoxicity secondary to cytotoxic drugs, but its meaning is questionable.

As a second part of this study, an individual analysis of the clinical cases was made, which showed that the overall response rate to rhG-CSF was 73,3%. Moreover, associations between the response rate and other variables were investigated and it was encountered an association with etiology ($p = 0,041$) and clinical outcome, classified as hospital discharge or patient death ($p = 0,001$).

Despite the small sample size, the results of the present dissertation suggest that the use of rhG-CSF in dogs and cats brings beneficial therapeutic effects on a hematological level and are well tolerated when administered in short protocols.

Keywords: dog, cat, neutropenia, granulocyte colony-stimulating factors, filgrastim, lenograstim.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice geral.....	vii
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas.....	ix
Índice de gráficos.....	x
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	xi
Capítulo I - Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio	1
1. Organização do estágio curricular	1
2. Atividades desenvolvidas.....	1
Capítulo II - Revisão bibliográfica.....	4
1. Fisiologia leucocitária	4
1.1. Leucopoiese	4
1.2. Cinética dos neutrófilos.....	5
1.3. Avaliação dos leucócitos.....	7
1.3.1. Leucograma.....	7
1.3.2. Exame da medula óssea.....	8
2. Neutropénia.....	9
2.1. Aumento do consumo de neutrófilos.....	12
2.1.1. Resposta inflamatória grave.....	12
2.2. Diminuição da produção de neutrófilos	14
2.2.1. Parvovirose canina.....	14
2.2.2. Panleucopénia felina.....	17
2.2.3. Retrovíroses felinas.....	18
2.2.3.1. Vírus da Imunodeficiência Felina.....	19
2.2.3.2. Vírus da Leucemia Felina.....	22
2.2.4. Eriquiose monocítica canina.....	26
2.2.5. Mielossupressão induzida por fármacos	28
2.2.6. Afeção primária da medula óssea	31
2.2.7. Hiperestrogenismo.....	32
2.2.8. Hematopoiese cíclica do <i>Collie</i> cinzento	33
2.3. Neutropénia imunomediada.....	34
3. Fator estimulador de colónias de granulócitos	35
3.1. Fatores estimuladores de colónias de granulócitos recombinantes humanos	36
3.1.1. Utilização em medicina humana.....	37
3.1.2. Utilização em medicina veterinária.....	39
3.2. Fator estimulador de colónias de granulócitos recombinante canino	43
3.3. Fator estimulador de colónias de granulócitos recombinante felino	44
Capítulo III - Estudo retrospectivo.....	45
1. Introdução.....	45
2. Objetivo	45
3. Materiais e métodos	45
3.1. Amostra e critérios de inclusão	45
3.2. Recolha dos dados	45
3.3. Parâmetros analisados e tratamento dos dados	46
3.4. Medicamentos	46
3.5. Equipamento.....	46
3.6. Análise estatística	46
4. Resultados.....	47
4.1. Caracterização da amostra	47

4.1.1. Canídeos.....	47
4.1.2. Felídeos	48
4.2. Caracterização da etiologia da neutropenia	49
4.3. Caracterização da neutropenia inicial	51
4.3.1. Caracterização da neutropenia inicial quanto à etiologia.....	51
4.4. Caracterização da utilização de rhG-CSF	53
4.4.1. Efeito nos parâmetros hematológicos	53
4.4.2. Taxa de resposta	55
4.4.2.1. Associação com a etiologia	56
4.4.2.2. Associação com o grau de neutropenia inicial	56
4.4.2.3. Associação com o desfecho clínico	57
5. Discussão.....	57
Capítulo IV - Conclusão.....	65
Capítulo V - Bibliografia	67
Capítulo VI - Anexos	77
Anexo 1 – Intervalos de referência do hemograma (VetScan HM5, Abaxis®)	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diferenciação dos leucócitos a partir de células estaminais da medula óssea. Adaptado de Tvedten & Raskin, 2012.....	4
Figura 2: Representação esquemática dos compartimentos celulares envolvidos na cinética dos neutrófilos. Adaptado de Weiser, 2012.....	6
Figura 3: Diagrama de fluxo referente à abordagem ao diagnóstico da causa da neutropenia. Adaptado de Weiser, 2012.....	10
Figura 4: Representação esquemática da cinética dos neutrófilos em casos de resposta inflamatória grave. Adaptado de Weiser, 2012.....	13

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Intervalos de referência do leucograma de cão e de gato, em valores absolutos. Adaptado de Weiser, 2012.....	7
Tabela 2: Principais diagnósticos diferenciais de neutropenia. Adaptado de Tvedten & Raskin, 2012.	11
Tabela 3: Classificação dos fármacos antineoplásicos em função do risco para induzir mielotoxicidade. Adaptado de Frimberger e Moore, 2009; Weiss, 2012.....	28
Tabela 4: Distribuição das frequências absoluta e relativa das raças dos canídeos da amostra.....	47
Tabela 5: Distribuição das frequências absoluta e relativa do sexo e estatuto reprodutivo dos canídeos da amostra.	48
Tabela 6: Distribuição das frequências absoluta e relativa das raças dos felídeos da amostra.....	48
Tabela 7: Distribuição das frequências absoluta e relativa do sexo e estatuto reprodutivo dos felídeos da amostra.	49
Tabela 8: Distribuição das frequências absoluta e relativa da etiologia da neutropenia da amostra.....	49
Tabela 9: Afeções subjacentes à utilização de fármacos citotóxicos da amostra.	50
Tabela 10: Caracterização do grau de neutropenia inicial nos canídeos e nos felídeos.....	51
Tabela 11: Distribuição da frequência relativa do rhG-CSF utilizado por etiologia na totalidade da amostra.....	53
Tabela 12: Caracterização quantitativa dos parâmetros hematológicos registados no hemograma inicial (T0) e de seguimento (T1) e resultado do <i>Wilcoxon Signed-Rank Test</i> na amostra de animais com infeção por parvovírus.	54
Tabela 13: Caracterização quantitativa dos parâmetros hematológicos registados no hemograma inicial (T0) e de seguimento (T1) e resultado do <i>Wilcoxon Signed-Rank Test</i> na amostra de animais com mielossupressão induzida por fármacos citotóxicos.	54
Tabela 14: Caracterização quantitativa dos parâmetros hematológicos registados no hemograma inicial (T0) e de seguimento (T1) e resultado do <i>Wilcoxon Signed-Rank Test</i> na amostra de animais com hipoplasia da medula óssea.	55
Tabela 15: Taxa de resposta aos rhG-CSF.....	55
Tabela 16: Tabela cruzada entre o grupo etiológico e a taxa de resposta.....	56
Tabela 17: Tabela cruzada entre o grau de neutropenia e a taxa de resposta.	56
Tabela 18: Tabela cruzada entre o desfecho clínico e a taxa de resposta.	57

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribuição da idade dos canídeos da amostra.....	48
Gráfico 2: Distribuição da idade dos felídeos da amostra.....	49
Gráfico 3: Distribuição das frequências absoluta e relativa da etiologia da neutropénia por espécie.	50
Gráfico 4: Distribuição dos casos de hipoplasia medular da amostra.....	51
Gráfico 5: Distribuição das frequências absoluta e relativa dos graus de neutropénia por etiologia.	52
Gráfico 6: Distribuição do número absoluto de neutrófilos iniciais por etiologia (canídeos). .	52
Gráfico 7: Distribuição do número absoluto de neutrófilos iniciais por etiologia (felídeos). ...	53
Gráfico 8: Taxa de resposta aos rhG-CSF por espécie.	55
Gráfico 9: Evolução da contagem de eritrócitos na cadela com TIM.	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHIM	Anemia hemolítica imunomediada
AINE	Anti-inflamatório não esteróide
ARN	Ácido ribonucleico
AZT	Azidotimidina
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementar
CPC	Clube Português de Canicultura
CPF	Clube Português de Felinicultura
DAMPs	<i>Damage-associated molecular pattern</i> , Padrões de moléculas associados a lesão
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i> , Agência Europeia do Medicamento
EMC	Erliquiose monocítica canina
FCI	<i>Fédération Cynologique Internationale</i> , Federação Cinológica Internacional
FeLV	Vírus da leucemia felina
FIFe	<i>Fédération Internationale Féline</i> , Federação Internacional Felina
FIV	Vírus da imunodeficiência felina
G-CSF	Fator estimulador de colónias de granulócitos
H ₀	Hipótese nula
HVL	Hospital Veterinário das Laranjeiras
IF	Imunofluorescência
IL	Interleucina
IV	Intravenoso
kg	Quilograma
LPS	Lipopolissacárido
Rácio M:E	Rácio mieloide/eritroide
m ²	Metro quadrado
mg	Miligrama
MU	Milhões de unidades
NIM	Neutropênia imunomediada
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> , Padrões de moléculas associados a agentes patogénicos
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PO	<i>Per Os</i>
PVC	Parvovírus canino
PVF	Parvovírus felino
rcG-CSF	Fator estimulador de colónias de granulócitos recombinante canino
rFeIFN- ω	Interferão ómega recombinante felino
rG-CSF	Fator estimulador de colónias de granulócitos recombinante felino
rhG-CSF	Fator estimulador de colónias de granulócitos recombinante humano
SC	Subcutâneo
SID	<i>Semel in die</i> (uma vez ao dia)
TIM	Trombocitopênia imunomediada
TR	Transcriptase Reversa
UFC	Unidade formadora de colónias
UI	Unidades Internacionais
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
WSAVA	<i>World Small Animal Veterinary Association</i>
μ g	Micrograma

μl	Microlitro
%	Percentagem
/	Por
®	Marca registada
=	Igual
<	Menor
≥	Maior ou igual
±	Mais ou menos

1. Organização do estágio curricular

O estágio curricular, incluído no âmbito do plano de estudos do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, foi realizado na área de Clínica de Animais de Companhia, no Hospital Veterinário das Laranjeiras (HVL), sob a orientação do Dr. Luís Cruz. O período do estágio teve a duração aproximada de 1040 horas, com início a 31 de Agosto de 2015 e término a 29 de Fevereiro de 2016, estando organizado em turnos rotativos com carga horária de 40 horas semanais. Dado o HVL ter disponibilidade de atendimento permanente – 24 horas por dia, todos os dias do ano – os turnos englobavam o período da manhã (9-17h), da tarde (14-22h) e, uma ou duas vezes por semana, da noite (21-9h).

2. Atividades desenvolvidas

Com o objetivo de desenvolver as competências teóricas e práticas e proporcionar contacto com a realidade de um ambiente hospitalar, os estagiários têm a oportunidade de se envolver nas diferentes valências da área clínica, nomeadamente medicina interna, cirurgia, internamento, meios complementares de diagnóstico e urgências.

Relativamente à medicina interna, foi possível assistir a consultas e participar ativamente na elaboração da história clínica, na realização de exames físicos e na preparação e administração de medicação oral e injetável, havendo, quando oportuno, uma discussão do plano de diagnóstico e tratamento com o médico veterinário responsável. Nesta medida, a casuística do hospital permitiu acompanhar consultas de medicina preventiva (profilaxia médica, *check-ups* gerais periódicos e programas de perda de peso em animais obesos), de seguimento de doentes com afeções crónicas, assim como consultas de primeira opinião e de referência das variadas especialidades (gastroenterologia, nefro-urologia, cardiologia, oncologia, dermatologia, endocrinologia, hematologia, pneumologia, oftalmologia, reprodução e obstetrícia, neurologia e ortopedia). No HVL também foi possível assistir, embora com menor frequência, a consultas da especialidade de exóticos, sendo os animais mais comuns lagomorfos, roedores e passeriformes. Deste modo, o tempo despendido na medicina interna permitiu não só desenvolver o raciocínio clínico e consolidar os conhecimentos acerca da abordagem a variadas situações, mas também aperfeiçoar a capacidade de comunicação através da interação diária com os clientes.

Na área da cirurgia, as funções do estagiário têm início nos procedimentos pré-cirúrgicos através da instituição do acesso venoso, administração da pré-medicação, tricotomia e antissepsia do campo cirúrgico, indução anestésica e intubação endotraqueal do animal com posterior conexão ao aparelho de anestesia inalatória e aos aparelhos de monitorização. Durante a cirurgia, o estagiário desempenha muitas vezes o papel de anestesista, sendo responsável pela monitorização dos sinais vitais do doente e da sua manutenção no plano

anestésico adequado. Consoante as necessidades do cirurgião, os estagiários também participam no ato cirúrgico, no qual desempenham as funções de ajudante. Durante o período de estágio foi ainda possível a realização de forma autónoma de pequenas intervenções, nomeadamente orquiectomias em gatos. Já no período pós-cirúrgico, procedia-se ao acompanhamento da recuperação do animal, continuando a monitorização dos seus sinais vitais e prestando os cuidados eventualmente necessários. Em termos de casuística, a maioria das cirurgias efetuadas no HVL incidem sobre tecidos moles, mas também foi possível acompanhar cirurgias oftalmológicas, ortopédicas e neurocirurgias.

O estagiário adquire também um papel preponderante na gestão do internamento, ficando responsável pelos cuidados diários dos animais (alimentações, passeios e higiene), procedimentos como limpezas de feridas e realização de pensos, monitorizações periódicas e administração das medicações. Durante o estágio foi também possível participar ativamente nos programas de reabilitação física que começaram a ser implementados no internamento do HVL no pós-operatório ortopédico e em animais com défices neurológicos tendo por base a termoterapia, massagem, mobilização passiva e exercícios ativos, nos quais se obtiveram resultados bastante positivos. Para além do internamento geral, o HVL dispõe também de uma unidade destinada a animais com doenças infectocontagiosas com normas específicas, que foi utilizada com alguma frequência devido à grande casuística de parvovirose canina e panleucopénia felina.

Relativamente aos meios complementares de diagnóstico, o HVL está equipado com um laboratório e serviços de imagiologia. Nesta medida, foi possível realizar diversos procedimentos de diagnóstico, nomeadamente análises sanguíneas (hemograma, perfil bioquímico sérico, provas de coagulação e esfregaços, com respetiva colheita por venopunção), estudos de urina e citologias, cujos resultados eram posteriormente comunicados ao médico veterinário responsável e se procedia à sua interpretação à luz do caso clínico. Na área da imagiologia foi possível participar em exames radiográficos, ecografias abdominais, ecocardiografias e eletrocardiogramas. No entanto, o HVL coopera também com laboratórios externos, envolvendo-se o estagiário na colheita e na correta identificação e acondicionamento das amostras.

A medicina de urgência e cuidados intensivos é também uma área de interesse por parte do corpo clínico do HVL, pelo que os estagiários são continuamente formados acerca do modo de atuação numa abordagem inicial e, posteriormente, após a estabilização do doente. Deste modo, aquando do aparecimento de urgências, o estagiário já se encontrava preparado e apto a colaborar com o resto da equipa de forma eficiente. De entre as urgências que foi possível acompanhar, referem-se os politraumatismos, o choque anafilático e a insuficiência cardíaca congestiva como as mais comuns.

O HVL é também um hospital de referência para a realização de procedimentos médicos que, na atualidade, ainda se encontram em crescente desenvolvimento nas ciências veterinárias,

entre os quais a endoscopia (de diagnóstico e intervencionista) e técnicas de substituição renal (diálise peritoneal e hemodiálise). Como tal, durante o período de estágio, foi possível assistir e, quando necessário, auxiliar na realização de diversas endoscopias incidentes sobre o trato gastrointestinal, aparelho respiratório e trato urogenital. Na vertente terapêutica, foi possível assistir a extrações de corpos estranhos (esofágicos e gástricos), a uma colocação de *stent* endotraqueal, dilatações esofágicas periódicas para resolução de estenose e irrigação intranasal de um antimicótico num caso de aspergilose. Em relação à hemodiálise, a estagiária acompanhou três casos clínicos em que se recorreu a esta técnica – dois referentes a doença renal crónica (um de etiologia desconhecida e outro derivado de exposição subcrónica ao anticongelante etilenoglicol) e um de insuficiência renal aguda secundária a leishmaniose. Através destes casos foi possível compreender os fundamentos teóricos desta abordagem terapêutica, assim como a montagem e funcionamento da máquina de hemodiálise.

De forma a consolidar os conhecimentos teóricos previamente adquiridos, os estagiários também se encontram diariamente envolvidos nas discussões dos casos clínicos, sendo estimulados a intervir com dúvidas e sugestões. Para além desta comunicação com os médicos veterinários e colegas estagiários, o HVL permite também o contacto com uma equipa de trabalho multidisciplinar composta por enfermeiros e auxiliares veterinários, rececionistas e veterinários de *marketing*, cuja dinâmica contribui para a formação dos estagiários a nível pessoal.

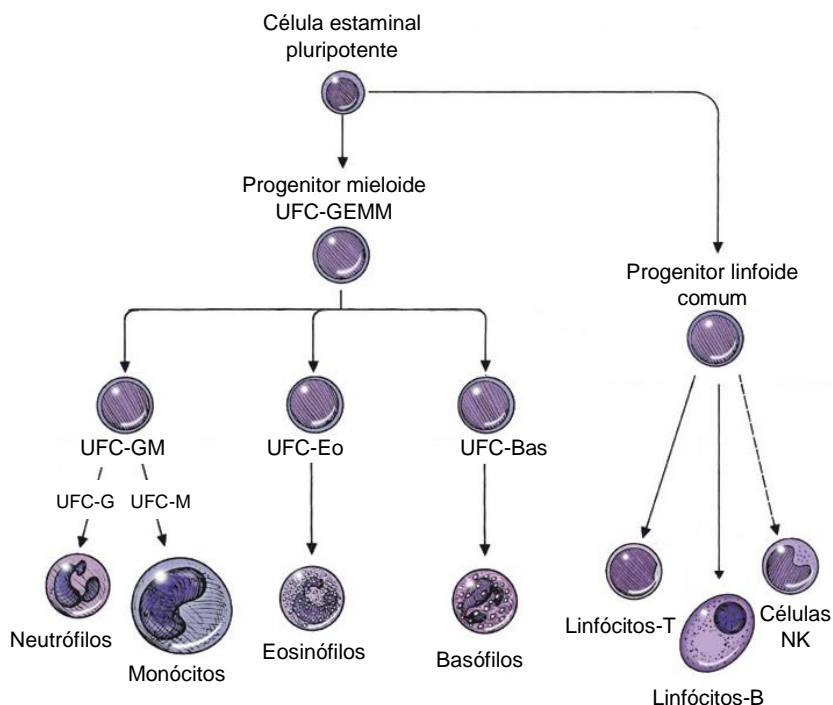
1. Fisiologia leucocitária

Os leucócitos, também designados por glóbulos brancos, são componentes do sistema imunitário, estando envolvidos em mecanismos de defesa contra processos de etiologia infecciosa e alérgica, e representam um grupo de células bastante heterogêneo em termos morfológicos e funcionais. Os leucócitos encontrados no sangue periférico do cão e do gato podem ser subdivididos em granulócitos, que englobam os neutrófilos, eosinófilos e basófilos por apresentarem granações específicas no seu citoplasma, e agranulócitos, onde se incluem os monócitos e linfócitos (Jackson, 2010).

1.1. Leucopoiese

Todos os leucócitos derivam de células estaminais pluripotentes – denominadas células estaminais hematopoiéticas – encontradas na medula óssea, sendo produzidos por um processo complexo denominado leucopoiese (figura 1), no qual intervêm diversas citocinas¹ (Tvedten & Raskin, 2012).

Figura 1: Diferenciação dos leucócitos a partir de células estaminais da medula óssea. Adaptado de Tvedten & Raskin, 2012.



Legenda: UFC = unidade formadora de colônias; GEMM = granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos; GM = granulócitos, macrófagos; Eo = eosinófilos; Bas = basófilos; NK = *Natural Killer*.

¹ Citocina: pequena molécula proteica que medeia a interação entre células.

As células estaminais hematopoiéticas consistem numa população celular com capacidade de autorrenovação, isto é, aquando da sua multiplicação, parte das células-filhas mantém a pluripotência e permanecem como células estaminais na medula óssea, enquanto a outra parte se diferencia e origina células progenitoras multipotentes responsáveis pela formação de duas linhagens celulares distintas: a mieloide e a linfoide. Do progenitor mieloide advêm células de menor potencialidade, nomeadamente a unidade formadora de colónias (UFC) de granulócitos e macrófagos (progenitor comum da síntese de neutrófilos e monócitos), a UFC de eosinófilos e a UFC de basófilos no âmbito dos leucócitos, assim como a UFC de eritrócitos e a UFC de megacariócitos, que culminam, respetivamente, na formação de eritrócitos e plaquetas. Por sua vez, o progenitor linfoide dá origem aos três tipos funcionais de linfócitos: linfócitos-B, linfócitos-T e células *Natural Killer* (Dunn, 2000; Messick, 2006; Junqueira & Carneiro, 2008).

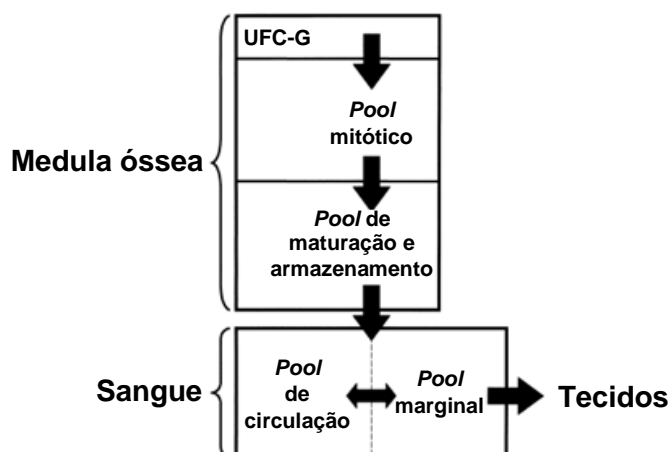
Na regulação de todo este processo está envolvida uma grande variedade de citocinas, incluindo interleucinas (IL), fatores estimuladores de colónias e fatores de crescimento, produzidos a nível local na medula óssea (exibindo comunicação do tipo parácrino ou autócrino) ou em locais distantes, sendo posteriormente transportadas pela corrente sanguínea (comunicação endócrina). Estas citocinas podem intervir a diferentes níveis da leucopoiese – precocemente, estimulando a multiplicação das células estaminais hematopoiéticas, ou mais tardiamente, exibindo uma especificidade crescente para uma dada linhagem celular (Messick, 2006; Harvey, 2012). Destas últimas, destacam-se pela sua relevância o fator estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF) que estimula a produção de neutrófilos, a IL-5 para os eosinófilos, o fator estimulador de colónias de macrófagos (M-CSF) para os monócitos, as IL-7 e IL-2 para os linfócitos-T, a IL-15 para as células *Natural Killer* e a IL-4 para os linfócitos-B (Jackson, 2010).

1.2. Cinética dos neutrófilos

Nas espécies canina e felina, os neutrófilos constituem o tipo celular predominante na fórmula leucocitária total. Dada a sua importância, a cinética dos neutrófilos tem sido alvo de variados estudos, sendo a que se encontra melhor compreendida de entre os leucócitos. Nesta medida, é usual recorrer-se ao conceito de *pools* ou compartimentos de células para descrever a dinâmica entre a produção dos neutrófilos na medula óssea, a sua libertação e circulação na corrente sanguínea e posterior migração para os tecidos (figura 2) (Tvedten & Raskin, 2012). Assim sendo, considera-se que a medula óssea se encontra organizada em dois compartimentos celulares: o *pool* mitótico, composto pelos mieloblastos, promielócitos e mielócitos, células precursoras responsáveis por garantir um aprovisionamento contínuo de neutrófilos, consoante as necessidades tecidulares; e o *pool* de maturação e armazenamento constituído pelos metamielócitos, bastonetes e neutrófilos segmentados, células desprovidas de capacidade mitótica que se acumulam na medula óssea de modo a criar uma população

de reserva (Tvedten & Raskin, 2012; Weiser, 2012). Como tal, em situações em que se verifica um grande consumo de neutrófilos nos tecidos, a existência deste compartimento de armazenamento evita a depleção destas células até que o *pool* mitótico aumente a sua produção, estando estimado que as reservas são suficientes para cinco dias de fornecimento (Dunn, 2000). Em condições fisiológicas, o mieloblasto requer aproximadamente 7 dias para completar os sucessivos passos até atingir a fase de neutrófilo segmentado (Weiser, 2012), dos quais 3-5 dias são referentes ao processo de maturação (Dunn, 2000).

Figura 2: Representação esquemática dos compartimentos celulares envolvidos na cinética dos neutrófilos. Adaptado de Weiser, 2012.



Legenda: ➡ = movimento unidirecional; ↔ = movimento bidirecional.

Relativamente à saída dos neutrófilos da medula óssea para a circulação sanguínea, sabe-se que, inicialmente, são libertados aqueles que se encontram em estadios mais maduros. No entanto, à medida que a reserva de neutrófilos segmentados se vai esgotando, os neutrófilos não segmentados e, como tal, mais imaturos (bastonetes e metamielócitos) vão sendo igualmente libertados, verificando-se o chamado desvio à esquerda (Tvedten & Raskin, 2012). No sangue, parte dos neutrófilos adere ao endotélio de pequenos vasos, particularmente aos capilares esplénicos e pulmonares (constituindo o *pool* marginal), enquanto o restante se encontra efetivamente em circulação dentro dos vasos (denominado *pool* de circulação, que é avaliado aquando da colheita sanguínea por venopunção). Porém, entre estes dois *pools* ocorrem trocas contínuas, podendo os neutrófilos marginais ser mobilizados de forma rápida em resposta a estímulos fisiológicos (como o *stress*, excitação ou exercício) ou patológicos. No cão os dois *pools* são aproximadamente iguais, enquanto no gato o *pool* marginal é cerca de duas a três vezes superior ao de circulação (Dunn, 2000; Tvedten & Raskin, 2012). Os neutrófilos podem permanecer cerca de 10-12 horas no sistema vascular antes de iniciarem a sua migração para os tecidos e cavidades corporais, nos quais podem sobreviver por mais 12 horas (Jackson, 2010). A migração faz-se por um processo designado por diapedese e é um fenómeno aleatório, isto é, independente da idade dos neutrófilos (os que

acabam de ser libertados da medula óssea têm igual probabilidade de migrar para os tecidos como aqueles que circulam há horas) e unidirecional, ou seja, não retornam à circulação sanguínea (Jackson, 2010; Tvedten & Raskin, 2012). É neste compartimento tecidual que os neutrófilos exercem a sua função primária de defesa do hospedeiro através da sua capacidade de fagocitar e eliminar microrganismos patogênicos invasores (Dunn, 2000).

1.3. Avaliação dos leucócitos

1.3.1. Leucograma

A análise quantitativa e qualitativa dos leucócitos é feita de forma rotineira na prática clínica veterinária através da realização do leucograma, parte integrante do hemograma. O leucograma engloba a contagem total dos leucócitos e contagem diferencial das suas subpopulações (expressas em valor absoluto e valor relativo percentual), geralmente determinadas por métodos automáticos, assim como a avaliação morfológica aquando da realização de um esfregaço sanguíneo.

Na tabela 1 podem ser observados os valores correspondentes aos intervalos de referência relativos à avaliação quantitativa dos leucócitos do cão e do gato. Contudo, é de referir que animais jovens (até aos 6-9 meses de idade) apresentam valores leucocitários mais elevados devido a um maior número absoluto de linfócitos (Dunn, 2000).

Tabela 1: Intervalos de referência do leucograma de cão e de gato, em valores absolutos. Adaptado de Weiser, 2012.

Leucócitos (x 10 ³ /µl)	Cão	Gato
Contagem total:	6,0 – 17,0	5,5 – 19,5
Contagem diferencial:		
Neutrófilos segmentados	3,0 – 11,5	2,5 – 12,5
Neutrófilos não segmentados	0,0 – 0,3	0,0 – 0,3
Linfócitos	1,0 – 5,0	1,5 – 7,0
Monócitos	0,0 – 1,2	0,0 – 0,8
Eosinófilos	0,1 – 1,2	0,0 – 1,5
Basófilos	0,0 – 0,1	0,0 – 0,1

Num animal saudável, o número de leucócitos mantém-se relativamente constante devido ao equilíbrio entre a sua produção na medula óssea e a saída da circulação sanguínea (Jackson, 2010). Deste modo, quando há alguma alteração, tanto no sentido da leucocitose (aumento do número total de leucócitos) ou da leucopénia (diminuição do número total de leucócitos), tal pode ser indicativo de que se encontra a decorrer um processo patológico. O leucograma deve ser, então, interpretado em conjunto com a anamnese e o exame clínico, assim como com os outros componentes do hemograma (nomeadamente o eritrograma e trombograma) e outros testes de diagnóstico adicionais eventualmente realizados (Dunn, 2000).

1.3.2. Exame da medula óssea

Em animais cujas alterações hematológicas não sejam passíveis de serem correlacionadas com uma determinada afeção, a análise da medula óssea torna-se um exame útil a incluir no plano de diagnóstico. Assim sendo, de entre as suas principais indicações destacam-se a presença de citopénias persistentes (anemia não regenerativa, neutropénia, trombocitopénia, bicitopénias e pancitopénia), policitémia ou trombocitose sem causa identificável, presença de células atípicas no sangue e no estadiamento de linfomas (Weiss & Tvedten, 2012). Todavia, os procedimentos realizados para a avaliação da medula óssea não são isentos de complicações, pelo que poderão estar contraindicados em animais com algum grau de imunossupressão e coagulopatias. Estas dificuldades podem, contudo, ser ultrapassadas com a adoção de uma técnica baseada nas boas práticas, através da realização de um procedimento asséptico e da aplicação de uma correta compressão no local da colheita (Bienzle, 2000).

Assim, podem ser realizadas duas metodologias que permitem obter diferentes amostras de medula óssea: a aspiração, a partir da qual se realiza um esfregaço para uma avaliação citológica e a biópsia para uma avaliação histopatológica, podendo a colheita de ambas ser feita no mesmo local. Enquanto a citologia incide exclusivamente sobre a quantidade e a morfologia das populações celulares hematopoiéticas, sendo raramente capaz de estabelecer um diagnóstico definitivo, a biópsia permite estudar a arquitetura medular (através da comparação da quantidade de células com os tecidos ósseo, conjuntivo e adiposo) e identifica os processos patológicos presentes, como neoplasias, mielonecrose, mielofibrose e osteólise. Deste modo, é fácil compreender que a avaliação simultânea da citologia e da biópsia medulares permite obter informações diferentes, mas complementares, acerca da afeção decorrente. No entanto, no contexto atual da medicina veterinária, a biópsia raramente é feita e a aspiração é, de facto, o exame realizado com mais frequência por ser tecnicamente mais fácil, rápido e menos dispendioso (Bienzle, 2000; Rudloff, 2013).

Na interpretação de uma citologia medular são avaliados de forma sistemática diversos parâmetros, nomeadamente: estimativa da quantidade total de células, sendo que amostras provenientes de animais jovens são mais celulares que as de animais geriátricos, nos quais se verifica uma substituição progressiva da medula óssea ativa por tecido adiposo (num animal jovem é fisiológico uma amostra apresentar 25-75% de células hematopoiéticas, enquanto que num animal geriátrico saudável a composição em tecido adiposo pode chegar aos 80-90%); estimativa da quantidade de megacariócitos; determinação do rácio mieloide/eritroide (M:E), que consiste no quociente entre o número total de células pertencentes à linhagem mieloide (mieloblastos, promielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastonetes e granulócitos segmentados) e o número total de células eritroides (rubriblastos, prorubricitos, rubricitos e metarubricitos), sendo o valor de referência em cães 0,75:1 – 2,5:1 e em gatos 1,2:1 – 2,2:1; verificação do processo de maturação de cada linhagem celular,

tendo em conta que 80% das células mielóides e eritroides devem ser relativamente maduras; estimativa das reservas de ferro (hemossiderina), apesar de estas não serem normalmente observadas em amostras de gatos e, conseqüentemente, a sua ausência nesta espécie não ter significado patológico; e, por último, identificação de eventuais alterações morfológicas celulares (Bienzle, 2000; Weiss & Tvedten, 2012).

2. Neutropénia

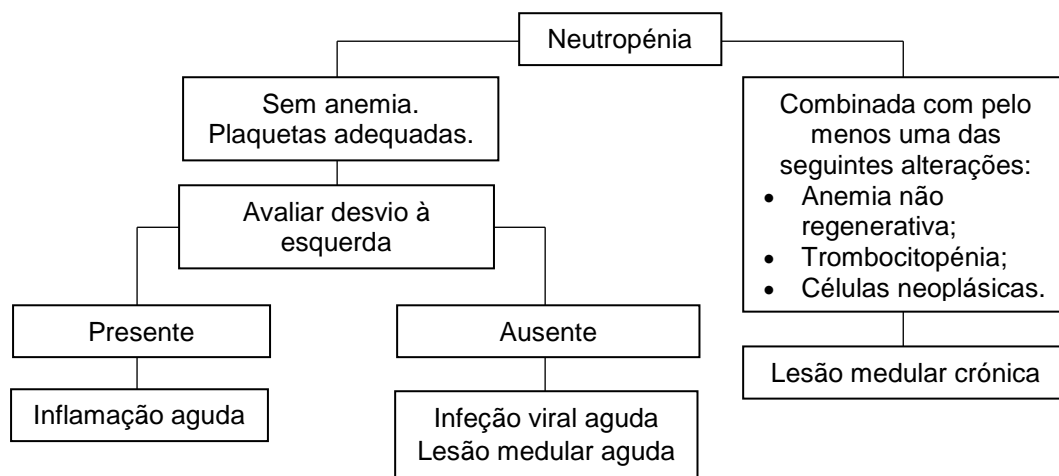
Neutropénia é o termo correspondente a uma contagem de neutrófilos no sangue periférico menor que o limite inferior do intervalo de referência para uma dada espécie e idade. O seu diagnóstico é possível através da realização do leucograma, no qual, regra geral, se observa uma leucopénia concomitante pelo facto dos neutrófilos serem os leucócitos mais abundantes (Dunn, 2000). Apesar disto, a neutropénia é um achado laboratorial relativamente raro nos animais de companhia devido ao grande compartimento de reserva destas células na medula óssea, como foi previamente referido (Tvedten & Raskin, 2012). Contudo, também é importante ter em consideração que uma neutropénia ligeira pode ocorrer na sequência de uma fluidoterapia intensiva com conseqüente hemodiluição, assim como pode ser um artefacto derivado da presença de coágulos na amostra sanguínea (Abrams-Ogg, 2000). Como última ressalva, torna-se pertinente lembrar que o número de neutrófilos num dado momento não reflete exclusivamente a sua taxa de produção e libertação no sangue, sendo também influenciado por outros fatores, nomeadamente as trocas celulares que continuamente ocorrem entre os *pools* marginal e de circulação e a taxa de migração para os tecidos (Dunn, 2000).

Sendo os neutrófilos importantes células do sistema imunitário envolvidas nos mecanismos de defesa de primeira linha contra a invasão de microrganismos patogénicos, depreende-se que a neutropénia tem o potencial de agravar o prognóstico devido ao alto risco de desenvolvimento de infeções graves, contribuindo de forma significativa para a morbilidade e mortalidade dos animais (Claus, 2015). De facto, segundo Abrams-Ogg (2000), não só o risco de infeção aumenta de forma exponencial à medida que o número de neutrófilos circulantes diminui, como também a duração temporal desta neutropénia vai ganhando significância como fator de prognóstico negativo. Segundo vários autores (Carey, 2003; Bailey, 2014; Fontaine, 2014), o risco de infeção é particularmente grande quando a contagem absoluta de neutrófilos no sangue periférico é inferior a $1,00 \times 10^3/\mu\text{l}$, pelo que este valor é muitas vezes utilizado como critério, abaixo do qual se devem adotar precauções especiais e, eventualmente, optar por iniciar uma terapêutica, nomeadamente a instituição de antibioterapia preventiva. As infeções são geralmente oportunistas, dado que o animal se encontra imunodeprimido e, como conseqüência, mais suscetível à sua microbiota comensal, sendo que os organismos mais frequentemente isolados são bactérias entéricas Gram-negativas (*Escherichia coli*,

Klebsiella sp. e *Enterobacter* sp.), bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp.) e, mais raramente, *Pseudomonas* sp. (Brown & Rogers, 2001a).

Os sinais clínicos eventualmente presentes não estão diretamente associados à neutropénia em si, mas sim à doença subjacente e/ou à infeção secundária. Assim sendo, na avaliação do doente torna-se crucial identificar a causa específica desta alteração leucocitária (Abrams-Ogg, 2000) e, para tal, é proposto na figura 3 um diagrama de fluxo relativo à abordagem ao diagnóstico da causa da neutropénia.

Figura 3: Diagrama de fluxo referente à abordagem ao diagnóstico da causa da neutropénia. Adaptado de Weiser, 2012.



De modo geral, considera-se que a neutropénia se pode desenvolver segundo três mecanismos principais: associada a doenças caracterizadas por uma resposta inflamatória de tal modo grave que é responsável por um consumo de neutrófilos nos tecidos superior à quantidade que é produzida e libertada na corrente sanguínea; associada a doenças que afetam a medula óssea, repercutindo-se não só numa diminuição da produção de neutrófilos, como também na de outras linhagens celulares; e associada a uma destruição imunomediada de neutrófilos (Tvedten & Raskin, 2012; Claus, 2015). Seguindo esta divisão, são apresentados na tabela 2 os diagnósticos diferenciais mais relevantes englobados em cada categoria.

Um estudo retrospectivo efetuado por Brown e Rogers (2001b) pretendeu avaliar as principais causas de neutropénia nos animais admitidos a um centro de atendimento médico veterinário no estado do Texas. Numa amostra de 261 animais, concluíram que em 51,8% dos casos a neutropénia se devia a doenças infecciosas não bacterianas, representando a parvovirose a causa mais comum em cães e o vírus da leucemia felina em gatos. Para além disto, verificaram que a mielossupressão induzida por fármacos constituía a segunda etiologia mais comum (11,4%), seguindo-se a neutropénia por consumo excessivo de neutrófilos em doenças inflamatórias graves, sépsis e endotoxémias (11,1%) e as afeções medulares

primárias (3,8%). A neutropénia imunomediada foi a causa de neutropénia mais rara (0,4%), sendo que nos restantes 21,5% dos animais não foi possível concluir acerca da etiologia da neutropénia.

Tabela 2: Principais diagnósticos diferenciais de neutropénia. Adaptado de Tvedten & Raskin, 2012.

	Espécies afetadas	
	Cão	Gato
Consumo de neutrófilos		
Resposta inflamatória grave	✓	✓
Infeção por parvovírus	✓	✓
Diminuição da produção de neutrófilos		
Infeção por parvovírus	✓	✓
Infeção por retrovírus felinos		✓
Infeção por <i>Ehrlichia canis</i>	✓	
Fármacos	✓	✓
Afeção primária da medula óssea	✓	✓
Hiperestrogenismo	✓	
Hematopoiese cíclica do <i>Collie</i> cinzento	✓	
Neutropénia imunomediada	✓	✓

Quando o doente se apresenta neutropénico, mas clinicamente estável (assintomático e sem febre), pode ser mantido em casa, sendo feitas recomendações ao proprietário no sentido de minimizar qualquer risco de infeção (Brown & Rogers, 2001a). As principais medidas que devem ser adotadas consistem em promover o isolamento do animal, resguardando-o sempre que possível dentro da habitação, evitar o contacto com outros animais e promover uma boa higiene do ambiente geral e do animal (Fontaine, 2014). Para além disto, o proprietário deve ser também educado a proceder a monitorizações constantes da atitude, apetite e temperatura retal do seu animal (Brown & Rogers, 2001a), assim como estar atento a sinais que indiquem deterioração do estado clínico (inapetência, letargia, extremidades quentes, procura de frio e arfar) (Fontaine, 2014). Apesar de levantar controvérsia, há também autores que advogam que nestas situações deve ser iniciada antibioterapia a título preventivo, recomendando a administração de antimicrobianos de largo espectro por via *Per Os* (PO) até à reversão da neutropénia (Brown & Rogers, 2001a).

Contudo, um animal com neutropénia que exiba concomitantemente febre ou que se apresente afebril, mas com afeção do estado geral, deve ser encarado como uma urgência que requer hospitalização com isolamento em infraestruturas próprias de modo a prevenir a ocorrência de infeções nosocomiais, devendo ser imediatamente instituída antibioterapia de largo espectro por via intravenosa (IV) (Brewer, 2003; Fontaine, 2014; Claus, 2015). A seleção do antimicrobiano deve ser baseada nas características fisiológicas do animal, na resposta clínica a antimicrobianos previamente utilizados e no agente que se suspeita estar a causar

infecção (Claus, 2015), sugerindo Brown & Rogers (2001a) a associação de um β -lactâmico com uma fluoroquinolona. Aquando de falha terapêutica com antimicrobianos de primeira e segunda linha, deve ser considerada a hipótese de estar a ocorrer uma infecção fúngica, o que é particularmente comum em medicina humana (Carey, 2003). Para além disto, deve ser ainda iniciada fluidoterapia IV recorrendo à administração de cristalóides numa taxa elevada e/ou colóides em doentes hemodinamicamente instáveis que exibam mucosas pálidas, tempo de repleção capilar aumentado, taquicardia e hipotensão (Fontaine, 2014; Claus, 2015).

Seguidamente serão abordadas de forma pormenorizada as principais causas de neutropénia nos animais de companhia, fazendo especial referência aos mecanismos fisiopatológicos que originam esta alteração leucocitária. De notar que, apesar da infeção por parvovírus ser responsável por um consumo de neutrófilos em larga escala, causa simultaneamente uma diminuição da sua produção na medula óssea (mecanismo mais importante), sendo por isto incluída neste capítulo.

2.1. Aumento do consumo de neutrófilos

2.1.1. Resposta inflamatória grave

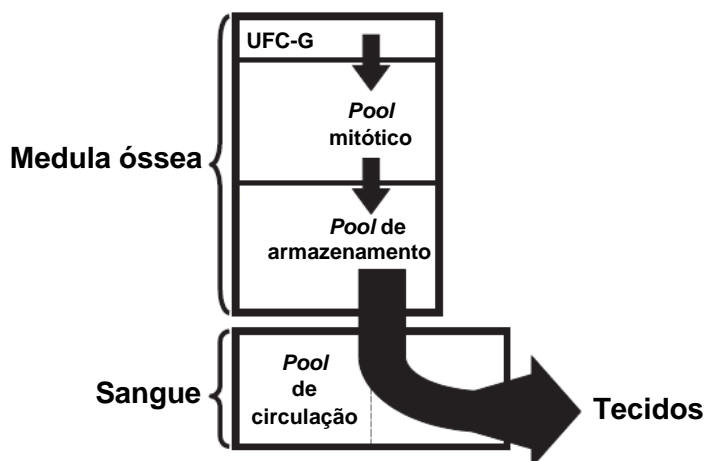
Aquando de uma lesão tecidual, o organismo desenvolve uma resposta inflamatória aguda, benéfica e organizada, na qual participam inúmeros mediadores químicos, podendo estar envolvidas na sua génese causas infecciosas, assim como traumáticas e isquémicas. Mais concretamente, os estímulos responsáveis por desencadear a cascata inflamatória consistem em moléculas que o sistema imunitário inato reconhece, pertencendo a um de dois grupos - PAMPs ou DAMPs. Os PAMPs (padrões de moléculas associados a agentes patogénicos) não são mais que moléculas estruturais encontradas à superfície dos microrganismos patogénicos, sendo exemplos o lipopolissacárido (LPS) das bactérias Gram-negativas e o peptidoglicano das bactérias Gram-positivas, e como tal encontram-se relacionados com a ativação da inflamação na presença de infeção. Por sua vez, em situações assépticas de lesão celular, como traumas ou queimaduras extensas, verifica-se a libertação de moléculas endógenas que sinalizam a ocorrência de necrose local, denominadas DAMPs (padrões moleculares associados a lesão). O reconhecimento dos PAMPs e DAMPs culmina então na produção de inúmeros mediadores pró-inflamatórios, mas também anti-inflamatórios que visam manter a inflamação restrita à área afetada e, deste modo, manter o equilíbrio homeostático (Male, Brostoff, Roth & Roitt, 2006; Randels, 2013).

Durante o processo inflamatório tornam-se evidentes os sinais clássicos que o caracterizam (calor, rubor, edema, dor e perda de função), estando o seu aparecimento diretamente relacionado com a vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo ao local afetado, aumento da permeabilidade capilar e estimulação das terminações nervosas nociceptivas. Em termos celulares, verifica-se a migração faseada de diferentes populações de leucócitos para o local

da inflamação, estando os neutrófilos envolvidos na fase inicial e surgindo os monócitos e linfócitos mais tardiamente. O recrutamento leucocitário é essencialmente regulado por quimiocinas (uma classe de citocinas com ação quimiotática), entre outras substâncias produzidas no tecido afetado, que promovem a marginação dos neutrófilos circulantes, a sua saída da vasculatura por diapedese e migração para os tecidos. Todos estes eventos contribuem para o objetivo final da resposta inflamatória que consiste em isolar a lesão, destruir os microrganismos patogénicos invasores e/ou inativar toxinas e auxiliar no processo de reparação (Male et al., 2006; Claus, 2015).

Quanto maior a população de microrganismos patogénicos ou mais extensa a área de tecido necrosado, mais forte é a resposta inflamatória desencadeada e, conseqüentemente, mais citocinas são libertadas e mais neutrófilos são recrutados perifericamente. Deste modo, pode ocorrer uma depleção dos neutrófilos do *pool* de circulação e, de modo compensatório, são libertados os neutrófilos presentes no *pool* de armazenamento da medula óssea (figura 4). Se persistente, o consumo de neutrófilos torna-se de tal modo significativo que leva à depleção desta população de reserva e ocorre libertação das formas imaturas. Verifica-se, portanto, uma neutropénia com desvio à esquerda degenerativo, resultante de uma taxa de consumo que supera a taxa de produção na medula óssea. As doenças inflamatórias que, potencialmente, podem culminar em neutropénia envolvem, de modo geral, tecidos com grande área de superfície, sendo exemplos a peritonite, enterite e pneumonia (Brown & Rogers, 2001a; Tvedten & Raskin, 2012; Claus, 2015).

Figura 4: Representação esquemática da cinética dos neutrófilos em casos de resposta inflamatória grave. Adaptado de Weiser, 2012.



Legenda: ➡ = direção do movimento dos neutrófilos.

No caso particular da endotoxémia, está também descrito que a libertação de endotoxinas estimula a marginação de neutrófilos através de uma chamada das células do *pool* de circulação para o *pool* marginal devido ao aumento da expressão de moléculas de adesão na

sua superfície. Contudo, este fenómeno causa apenas uma pseudoneutropénia transitória (não se considerando, por isto, uma neutropénia verdadeira) de curta duração (Tvedten & Raskin, 2012).

2.2. Diminuição da produção de neutrófilos

2.2.1. Parvovirose canina

O parvovírus canino (PVC) é responsável por causar uma das doenças infecciosas mais frequentes em canídeos, estando na sua etiologia a estirpe PVC-2. Como o nome indica, o PVC-2 é um vírus de pequena dimensão, com uma cadeia simples de ADN (ácido desoxirribonucleico) e sem envelope, o que o torna extremamente resistente a condições ambientais adversas (podendo sobreviver durante meses ou anos fora do hospedeiro) e à inativação pelos detergentes e desinfetantes convencionais (Greene & Decaro, 2012; Barr, 2013). A estirpe original PVC-2 emergiu por volta de 1977, possivelmente a partir de mutações num parvovírus existente de um hospedeiro carnívoro, tendo sido substituída na década de 80 por duas variantes antigénicas, o PVC-2a e o PVC-2b, que se tornaram predominantes a uma escala mundial. Em 2000 foi identificada uma nova variante, o PVC-2c, que também tem exibido uma rápida expansão geográfica (Crawford & Sellon, 2010; Mylonakis, Kalli & Rallis, 2016). Enquanto a estirpe original produz apenas infeção em membros da família Canidae, já foi demonstrado que as novas variantes PVC-2a, 2b e 2c são também capazes de se replicar em felinos em circunstâncias naturais e experimentais (Greene & Decaro, 2012).

A parvovirose canina pode afetar cães de qualquer raça, idade e sexo. No entanto, cachorros com idade compreendida entre as 6 semanas e os 6 meses e raças como a *Rottweiler*, *Dobermann*, *American Staffordshire Terrier*, Retriever do Labrador, Cão de Pastor Alemão, Malamute do Alaska e *English Springer Spaniel* parecem apresentar um risco aumentado (Glickman, Domanski, Patronek & Visintainer, 1985; Houston, Ribble & Head, 1996; Crawford & Sellon, 2010; Greene & Decaro, 2012).

O PVC é altamente contagioso, ocorrendo a transmissão por via oronasal através do contacto direto com os produtos virulentos (particularmente, fezes contaminadas) ou indireto através de fomites. O período de incubação do PVC-2 é de 7-14 dias, mas para as três novas variantes pode ser tão curto como 4-6 dias. Após a exposição, a replicação viral tem início no tecido linfóide da orofaringe e nos linfonodos regionais, disseminando-se o PVC por via hematogénea (fase de virémia) em 3-5 dias. Pelo facto do PVC requerer células com elevado índice mitótico para se replicar, exhibe tropismo para tecidos de grande renovação celular e, como tal, desloca-se para o trato gastrointestinal, onde infeta o epitélio germinal das criptas intestinais, para tecidos linfóides (como linfonodos e o timo), medula óssea e, em cachorros com idade inferior a 6 semanas, para o miocárdio. A excreção fecal do vírus tem início 3-4 dias após a exposição, ou seja, antes do animal exibir qualquer sinal clínico, mantendo-se por 7-10 dias (Crawford & Sellon, 2010; Greene & Decaro, 2012).

Como principais consequências da infecção por PVC referem-se: a nível intestinal, a necrose do epitélio com diminuição da renovação celular e atrofia das microvilosidades, culminando numa diminuição da absorção dos nutrientes e quebra da integridade da barreira intestinal; a nível dos órgãos linfoides, necrose com destruição de linfócitos e atrofia do timo; e a nível da medula óssea, a depleção de células precursoras mieloides e eritroides, o que afeta a produção de leucócitos e eritrócitos. Contudo, uma vez que os eritrócitos têm um tempo médio de vida relativamente grande (120 dias), os efeitos sobre esta população celular são pouco notados, ao passo que as alterações leucocitárias são um achado laboratorial precoce (Greene & Decaro, 2012; Barr, 2013).

A leucopénia tende a surgir durante os primeiros quatro dias após infecção (Frazão, 2008) e a sua magnitude deve-se essencialmente a neutropénia e linfopénia (Mylonakis et al., 2016). O mecanismo pelo qual a neutropénia se desenvolve é multifatorial, sendo o efeito cumulativo da diminuição da produção de neutrófilos na medula óssea devido à destruição das suas células precursoras pelo PVC, do seu consumo a nível periférico, assim como da sua perda através da barreira intestinal lesada (Barr, 2013; Mylonakis et al., 2016).

O quadro clínico inerente à parvovirose canina é característico, exibindo uma progressão extremamente rápida. De entre os primeiros sinais clínicos destacam-se a depressão, anorexia e febre que evolui numa questão de dias para vômito incoercível e diarreia profusa (inicialmente mucoide e depois hemorrágica), desidratação e prostração – a este quadro atribui-se a designação de “forma entérica”. Quando a infecção ocorre *in utero* ou no período neonatal, o PVC infeta também os miócitos cardíacos devido à grande multiplicação celular que se observa nesta altura, dando origem à “forma cardíaca”. Nesta, é comum que se encontrem afetados todos os cachorros da mesma ninhada, podendo haver sinais de disfunção cardíaca (precedidos ou não por sinais entéricos) ou ocorrer morte súbita (Greene & Decaro, 2012; Barr, 2013).

A presença desta sintomatologia típica em animais jovens não vacinados, com um protocolo de vacinação incompleto ou que falharam em responder à primovacinação e nos quais se encontram as alterações leucocitárias previamente referidas levanta um forte índice de suspeição de parvovirose; no entanto, estes não são critérios patognomónicos. De modo a obter o diagnóstico definitivo, encontra-se disponível uma diversidade de testes que permitem detetar o PVC. Atualmente, os mais utilizados, por serem testes rápidos que são facilmente realizados na prática clínica, baseiam-se na imunomigração rápida ou na metodologia ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), sendo capazes de detetar o antigénio viral nas fezes, sem, contudo, permitirem a distinção da estirpe envolvida. Apesar das suas altas especificidade e sensibilidade, podem surgir resultados falsos negativos durante o período inicial da afeção, antes da excreção viral nas fezes atingir o seu pico, e resultados falsos positivos quando o teste é realizado 4-10 dias após imunização dos cães com vacinas vivas atenuadas. Outra técnica que tem exibido importância crescente é o PCR (*Polymerase Chain*

Reaction) que deteta o genoma viral nas fezes ou no sangue e, por ser um teste com maior sensibilidade, pode ser utilizado para esclarecer resultados que se suspeite serem falsos negativos, sendo também útil quando se pretende caracterizar a estirpe em questão. Alternativamente, existem outros testes que permitem detetar o agente (prova de hemaglutinação com recurso a eritrócitos porcinos, isolamento viral e microscopia eletrónica), mas estas técnicas são hoje raramente utilizadas. Relativamente aos testes serológicos, estes não são indicados para diagnosticar infeção por PVC tendo em conta que a maioria dos cães pode apresentar anticorpos vacinais ou ter sido previamente exposta ao vírus. Todavia, é de referir a sua utilidade na avaliação do título de anticorpos em cachorros, assim como em indivíduos com protocolo vacinal desconhecido (Greene & Decaro, 2012).

Não existindo uma terapêutica especificamente direcionada contra o PVC, o manejo da parvovirose assenta no tratamento sintomático e de suporte, estando descrito que a taxa de sobrevivência pode ser tão baixa como 10% em cães não tratados, assim como atingir os 80-95% com o tratamento adequado e instituído precocemente (Crawford & Sellon, 2010). Assim sendo, a fluidoterapia é, com grande unanimidade, um dos pilares terapêuticos mais importantes, pois permite restabelecer o equilíbrio hídrico e eletrolítico do doente, podendo ser necessário suplementar com potássio e dextrose para corrigir, respetivamente, a hipocaliémia e hipoglicémia que se encontram com relativa frequência nesta afeção. A instituição de antibioterapia com espectro para bactérias Gram-negativas e anaeróbias é também largamente recomendada devido ao risco de sépsis, dado que a quebra da barreira intestinal pode originar translocação de bactérias intestinais para a corrente sanguínea. Em termos sintomáticos, deve realizar-se terapêutica antiemética, em caso de vômito persistente, e analgésica (Crawford & Sellon, 2010; Greene & Decaro, 2012; Barr, 2013). Apesar da ausência de fundamentos científicos, era procedimento comum promover um período de jejum com o objetivo de “descansar” o trato gastrointestinal. No entanto, hoje sabe-se que esta abordagem nutricional conduz a uma atrofia das vilosidades intestinais com diminuição da renovação celular, diminuição da imunidade local e aumento da permeabilidade. Efetivamente, a presença de nutrientes no lúmen intestinal funciona como estímulo para a manutenção da integridade da mucosa e, por esta razão, deve ser fornecida alimentação por via entérica o mais precocemente possível (Mohr et al., 2003). Ainda assim, apesar de todos os esforços, a parvovirose é ainda hoje uma doença com prognóstico bastante reservado.

No sentido de verificar a utilidade do leucograma como fator de prognóstico, Goddard et al. (2008) avaliaram de que forma as contagens leucocitárias se alteravam ao longo do tempo em cachorros com parvovirose, tendo os resultados mostrado que a presença de leucopénia grave, linfopénia, monocitopénia e eosinopénia, assim como a ausência de desvio à esquerda às 24 horas após instituição do tratamento estão associadas a pior prognóstico.

O principal método de prevenir a infeção pelo PVC assenta na vacinação dos animais. Para tal, as atuais recomendações da *World Small Animal Veterinary Association* (WSAVA)

sugerem um protocolo vacinal que consiste numa primovacinação com início às 6-8 semanas de idade, revacinando a cada 2-4 semanas até atingirem a idade mínima de 16 semanas. Posteriormente deve ser efetuado um reforço aos 6 meses ou ao ano de idade (ficando o critério à escolha do clínico), sendo suficientes a partir deste momento revacinações a cada 3 anos (Day, Horzinek, Schultz & Squires, 2015).

2.2.2. Panleucopénia felina

A panleucopénia felina é uma doença em quase tudo idêntica à parvovirose canina, sendo causada por um parvovírus felino (PVF), capaz de afetar todos os membros da família Felidae, mas também animais de outras espécies como a marta, o furão e o guaxinim. À semelhança do PVC, o PVF é altamente contagioso e resistente no ambiente, podendo ser transmitido por contacto direto e indireto. No entanto, ao contrário do que ocorre nos cães, parece existir uma sazonalidade inerente aos surtos de panleucopénia coincidente com o período de nascimento dos gatinhos – classe etária mais suscetível ao PVF (Truyen et al., 2009; Greene, 2012). Após exposição oronasal, o vírus replica-se no tecido linfóide da orofaringe e, dentro de 2-7 dias, dissemina-se através de uma fase de virémia para tecidos com grande atividade mitótica (criptas do intestino delgado, medula óssea e tecidos linfóides), produzindo consequências homólogas às referidas para a parvovirose canina (Greene, 2012; Litster, 2014). Uma diferença notória relaciona-se com o facto de o desenvolvimento do cerebelo dos gatinhos ocorrer sobretudo na fase final da gestação. Como tal, quando a infeção ocorre *in utero* ou no período neonatal, o PVF exhibe tropismo para o cerebelo, para o qual se desloca, repercutindo-se em lesões caracterizadas por hipoplasia do mesmo (Greene, 2012).

A sintomatologia exibida pelos animais é influenciada por diversos fatores, entre os quais a idade, estatuto imunitário e presença de infeções concomitantes (Kruse, Unterer, Horlacher, Sauter-Louis & Hartmann, 2010), podendo variar desde um quadro subclínico a um quadro hiperagudo com morte súbita (Litster, 2014). A forma clínica mais frequente é, contudo, aguda (caracterizada por um período de incubação de 3-7 dias) com sinais clínicos e evolução muito semelhantes à enterite por PVC, ou seja, história de anorexia, depressão e febre que, em poucos dias, evolui para vômito, desidratação e prostração, sendo a diarreia uma manifestação observada com menor frequência que em cães. Por sua vez, os gatinhos com lesões do cerebelo exibem ataxia, tremores e hipermetria, que desaparecem com o repouso (Greene, 2012).

O diagnóstico desta afeção é muitas vezes presuntivo, com base na história, sinais clínicos e presença de leucopénia no hemograma, apesar de este achado laboratorial não aparecer em todos os casos (Greene, 2012). Contudo, o antigénio viral pode ser detetado nas fezes através do recurso a testes de imunomigração rápida específicos para o PVF, apesar dos testes rápidos comerciais desenhados para a espécie canina também poderem ser empregues. O PCR é outra técnica atualmente utilizada que permite detetar o PVF no sangue ou nas fezes

e, como tal, pode ser utilizado para confirmar resultados negativos em que o índice de suspeição clínico de panleucopénia é forte. Tal como na parvovirose canina, existem outros métodos de diagnóstico que foram caindo em desuso, nomeadamente a prova de hemaglutinação com eritrócitos porcos, isolamento do vírus em culturas celulares e microscopia eletrónica. Já os testes serológicos apresentam igualmente valor de diagnóstico limitado, dado que não permitem a distinção entre anticorpos vacinais e não-vacinais (Truyen et al., 2009).

O tratamento da panleucopénia consiste no isolamento dos animais e instituição de terapêutica de suporte (fluidoterapia, antibioterapia de largo espectro, medicação antiemética, analgesia e nutrição entérica), tal como descrito na parvovirose canina. Contudo, o prognóstico desta afeição é reservado, mostrando-se mais favorável aquando da intervenção precoce (Truyen et al., 2009; Greene, 2012). No sentido de colmatar a escassez de informação relativa a possíveis fatores de prognóstico na panleucopénia felina, Kruse et al. (2010) estudaram diversos parâmetros clínicos e laboratoriais, tendo verificado que a presença de leucopénia, trombocitopénia, hipoalbuminémia e hipocaliémia, na altura da apresentação, está associada a um pior desfecho clínico.

O principal meio de prevenção da panleucopénia felina é através da vacinação, sendo que atualmente a WSAVA advoga que a primovacinação em gatinhos se inicie às 6-8 semanas de idade, revacinando a cada 2-4 semanas até atingir a idade mínima de 16 semanas. Depois, é recomendado um reforço aos 6 meses ou ao ano de idade (ficando o critério à escolha do clínico) e, a partir deste momento, são efetuadas revacinações trianuais (Day et al., 2015).

Como já referido, apesar de ser um fenómeno raro, as variantes antigénicas do PVC (2a, 2b e 2c) são também capazes de infetar felídeos (Truyen et al., 2009), registando-se uma prevalência inferior a 5% de todas as infeções por parvovírus nestas espécies (Greene, 2012). O quadro clínico que estes agentes virais causam são, regra geral, mais ligeiros que os causados pelo PVF; todavia, foi descrito em Portugal um caso de uma gata de 5 meses, não vacinada, com infeção por PVC-2c que exibiu doença associada a um quadro clínico grave (Miranda, Parrish & Thompson, 2014). Considerando que na maioria dos diagnósticos de panleucopénia não se determina a estirpe de parvovírus envolvida, este estudo ressalva a importância de se proceder a mais investigações no sentido de conhecer a real prevalência da infeção por PVC em gatos, assim como a sua significância clínica. Não obstante, as normas de orientação da *European Advisory Board on Cat Diseases* informam que as atuais vacinas contra o PVF parecem conferir imunidade cruzada contra as novas variantes do PVC (Truyen et al., 2009).

2.2.3. Retrovíroses felinas

Os retrovírus felinos, membros da família Retroviridae, são viriões constituídos por um genoma de duas cadeias simples de ARN (ácido ribonucleico), nucleocápside, matriz e

cápside proteicas, envolvidos por um envelope lipídico, o qual limita a sobrevivência destes vírus a poucos minutos quando fora do hospedeiro e os torna suscetíveis a vários desinfetantes (Murphy, Gibbs, Horzinek & Studdert, 1999; Hosie et al., 2009; MacLachland & Dubovi, 2011). O genoma dos retrovírus contém três genes maiores: o *gag* que codifica proteínas da nucleocápside, da matriz e da cápside; o *pol* que codifica proteínas enzimáticas, de entre as quais se destaca pela sua importância a transcriptase reversa (TR); e o *env* que codifica proteínas precursoras das glicoproteínas encontradas à superfície do envelope. Enquanto o genoma dos retrovírus simples é apenas constituído por estes três genes, os chamados retrovírus complexos contêm ainda genes adicionais que participam na regulação da replicação viral (Murphy et al., 1999; Dunham & Graham, 2008; MacLachland & Dubovi, 2011).

Através da ligação das glicoproteínas de superfície virais aos recetores celulares (fenómeno denominado adsorção), o virião é capaz de penetrar na célula por fusão com a membrana celular. Devido à ação da TR, o ARN é copiado para uma molécula de ADN complementar (cADN) que, posteriormente, é complementado de modo a dar origem a uma cadeia dupla de ADN, que entra no núcleo da célula e se integra no genoma do hospedeiro (provírus). A transcrição do genoma viral tem como principal destino a produção de novos viriões que adquire o envelope ao sair da célula infetada por gemulação (Murphy et al., 1999; Dunham & Graham, 2008; MacLachland & Dubovi, 2011).

2.2.3.1. Vírus da Imunodeficiência Felina

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um retrovírus complexo do género *Lentivirus* que tem sido isolado no gato doméstico e em felídeos silvestres, como o lince, apresentando uma distribuição geográfica mundial (Hosie et al., 2009). Desde que o FIV foi descoberto, em 1986, vários estudos têm sido feitos no sentido de determinar a seroprevalência desta doença e tem-se concluído que é bastante variável, consoante o local considerado (Sellon & Hartmann, 2012). Em Portugal, um estudo realizado por Duarte e colaboradores (2009) mostrou que a prevalência de FIV em gatos errantes da zona metropolitana de Lisboa foi de 10,2%. Devido ao grande número de mutações e recombinações, particularmente no gene *env*, considera-se que existe neste uma região hipervariável que tem permitido uma classificação em diferentes subgrupos. Atualmente, já foram reconhecidos cinco subgrupos (A, B, C, D e E), tendo recentemente sido descoberto um novo subgrupo F, cuja prevalência varia geograficamente. Um gato naturalmente infetado pode conter mais que um subgrupo (superinfecção), situação que predispõe ao aparecimento de novos subtipos através de recombinações entre eles (Sellon & Hartmann, 2012).

O principal modo de transmissão é horizontal através da inoculação parentérica dos produtos virulentos (saliva e sangue), a qual ocorre através de manifestações de comportamentos agressivos, nomeadamente mordeduras e arranhões. Por este motivo, os gatos machos

inteiros, adultos e de vida livre são os que se encontram em maior risco. A transmissão vertical *in utero* transplacentária ou neonatal (através da ingestão do leite) a partir de uma gata infetada para os seus descendentes também pode ocorrer, mas é uma situação pouco comum. Apesar da transmissão por via oronasal ou venérea nunca ter sido documentada em condições naturais, experimentalmente já foi possível infetar gatos através da inoculação viral pela mucosa nasal, bucal, vaginal e retal e o vírus já foi detetado no sémen (Hosie et al., 2009; Sellon & Hartmann, 2012; Fenimore, 2014).

Numa perspetiva clínica, a progressão da infeção pelo FIV pode ser dividida em três fases evolutivas: a fase aguda, a de portador assintomático e a terminal. A fase aguda tem início aquando da inoculação do vírus, o qual vai infetar linfócitos e macrófagos de órgãos linfoides (timo, baço e linfonodos) e células das glândulas salivares. Cerca de duas semanas pós-inoculação, o vírus pode ser encontrado no plasma, atingindo-se o pico desta virémia às 8-12 semanas, e disseminar-se para células mononucleares (linfócitos e macrófagos) da medula óssea e órgãos não-linfoides como pulmões, trato intestinal, cérebro e rins. Durante este período podem surgir sinais clínicos ligeiros e inespecíficos, nomeadamente febre, letargia, anorexia e linfadenomegália generalizada. O decréscimo da carga viral no plasma, em virtude da montagem de uma resposta imunitária humoral e celular, marca o início da fase assintomática que pode durar anos. Apesar de vigorosa, a resposta imunitária é contudo ineficaz, pois não elimina a infeção e o vírus continua a replicar-se. Durante este período os gatos infetados permanecem clinicamente saudáveis de tal modo que, na generalidade dos casos, a doença só se desenvolve tardiamente, sendo comumente diagnosticada entre os 4-6 anos de idade. Após a fase assintomática, a infeção pode progredir para a fase terminal na qual a virémia aumenta como consequência da disfunção imunitária que se vai instalando de forma progressiva, particularmente devido à depleção de linfócitos que têm um papel em estimular e manter a imunidade celular e humoral (chamados linfócitos-T CD4+). Nesta fase, a maioria dos sinais clínicos presentes são resultado de infeções secundárias oportunistas (bacterianas, virais, fúngicas ou parasitárias) que se instalam devido ao estado imunodeprimido do doente. Outros sinais clínicos bastante comuns são o desenvolvimento de gengivoestomatite crónica, sinais neurológicos (alterações comportamentais, convulsões e alteração do ciclo do sono) e doença ocular (Hosie et al., 2009; Sellon & Hartmann, 2012).

Em termos de diagnóstico, durante a evolução da infeção surgem alterações hematológicas que podem ser detetadas através do hemograma. Assim, na fase aguda os gatos podem exibir neutropénia e linfopénia que se resolvem com a transição para a fase assintomática. Nesta, tanto o hemograma, como os parâmetros bioquímicos séricos, encontram-se geralmente dentro dos valores de referência. No entanto, já foi observada a ocorrência ocasional de pancitopénia em gatos assintomáticos FIV-positivos, nos quais não se detetaram outras causas possíveis (Sellon & Hartmann, 2012). Um estudo efetuado por Gleich e Hartmann (2009) comparou as alterações hematológicas observadas em gatos assintomáticos infetados

com FIV com as observadas em gatos controlo e verificaram que a prevalência de neutropénia foi significativamente superior na população de gatos com FIV, ao passo que a ocorrência de anemia e trombocitopénia não foi significativamente diferente quando comparada com o grupo controlo. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar esta pancitopénia, porém ainda não foi atingido um consenso. Enquanto alguns autores defendem que se deve à infeção de células do estroma medular e alteração do perfil de citocinas que prejudicam o crescimento e diferenciação das células hemáticas, causando hipoplasia medular (Gleich & Hartmann, 2009), outros referem ainda a possibilidade de ser resultado da infeção das células hematopoéticas precursoras ou da sua destruição imunomediada (Fujino et al., 2008).

O diagnóstico definitivo de FIV é frequentemente realizado através de testes que pretendem detetar a presença de anticorpos anti-FIV no sangue. A maioria dos gatos produz anticorpos nos primeiros 60 dias após exposição, apesar de nalguns poder ocorrer um atraso nesta resposta. Na prática clínica recorrem-se a testes baseados na metodologia ELISA ou testes de imunomigração rápida que detetam anticorpos dirigidos contra proteínas virais estruturais (como a p24 da cápside e a gp41 transmembranar) (Hosie et al., 2009; Sellon & Hartmann, 2012). Estes testes são largamente utilizados, tendo em conta que o despiste de FIV é recomendado em inúmeras situações, nomeadamente em gatos nunca testados, gatos doentes (mesmo com resultado negativo prévio), antes de uma adoção, gatos que tenham tido contacto recente com um gato infetado ou potencialmente infetado (gatos errantes), gatos com marcas de agressão felina, com história de vida livre e dadores de sangue. No entanto, estes testes apresentam limitações. Por um lado, podem ocorrer resultados falsos negativos quando a infeção se encontra na fase inicial (aguda), pelo que se recomenda a repetição do teste passados, no mínimo, 60 dias. Por outro lado, já foi demonstrada a presença de anticorpos maternos adquiridos de forma passiva em gatinhos até aos 6 meses de idade, pelo que nestes casos o teste pode originar um resultado falso positivo e, por isto, não é recomendada a sua realização antes desta idade (Sellon & Hartmann, 2012; Fenimore, 2014). A obtenção de resultados positivos em gatos clinicamente saudáveis ou com baixo risco de exposição deve ser sempre confirmada. Para tal, pode repetir-se a deteção de anticorpos ou recorrer a métodos que permitem detetar o antigénio, de entre os quais se destaca o PCR *real-time* (que permite quantificar a carga viral), cuja utilização tem vindo a aumentar. Apesar de fiável, o isolamento viral é demasiado laborioso e, como tal, não se realiza por rotina (Hosie et al., 2009; Sellon & Hartmann, 2012).

Não existindo nenhum tratamento específico com eficácia a longo prazo, esta área é ainda hoje alvo de muitas investigações. Na terapêutica do FIV podem ser utilizados fármacos antivirais, mas até à data são poucos os estudos científicos controlados que possam fundamentar a sua eficácia. De todos, o AZT (azidotimidina) é o que se encontra melhor estudado, estando descrito que diminui a carga viral plasmática, melhora o estado clínico do animal e aumenta a sua sobrevivência e qualidade de vida. No entanto, a anemia não

regenerativa é um efeito adverso comum e o FIV pode tornar-se resistente ao AZT. Com o objetivo de promover uma melhoria na função imunitária são também muitas vezes utilizados imunoestimulantes, de entre os quais se destaca o interferão ómega recombinante felino (rFeIFN- ω) (Sellon & Hartmann, 2012). Estudos prévios concluíram que o rFeIFN- ω induz uma melhoria clínica e aumento da sobrevivência dos felinos, contudo, o protocolo que se encontra autorizado (três ciclos de 1 MU/kg/dia via subcutânea [SC], durante 5 dias) é dispendioso. Assim, Gil et al. (2013) ensaiaram um protocolo terapêutico com administração por via oral (0,1 MU/gato, SID [uma vez ao dia], durante 90 dias), de forma a comparar a sua eficácia, tendo os seus resultados mostrado que o protocolo PO não era inferior ao SC, representando assim uma boa alternativa. Para além disto, os gatos FIV-positivos necessitam de um maneio específico, nomeadamente o seu isolamento para minimizar a ocorrência de infeções secundárias e o risco de transmissão a outros gatos, a promoção da castração em gatos inteiros para reduzir o comportamento agressivo, boa nutrição e exames médicos semianuais (Sellon & Hartmann, 2012).

2.2.3.2. Vírus da Leucemia Felina

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um retrovírus simples, pertencente ao género *Gamaretrovirus*, capaz de infetar o gato doméstico e pequenos felídeos silvestres, como o gato-bravo e o lince. Durante muitos anos a infeção por FeLV foi considerada umas das principais causas de mortalidade nos gatos, no entanto, devido às medidas de prevenção atualmente disponíveis, a importância epidemiológica deste vírus tem vindo a diminuir drasticamente. A infeção por FeLV ocorre a nível mundial, mas a sua prevalência está sujeita a variações geográficas (Lutz et al., 2009). Um estudo realizado em Portugal mostrou que a prevalência de FeLV nos gatos errantes, na zona metropolitana de Lisboa, foi de 7,1% (Duarte et al., 2009).

Tendo em conta o mapa genético, o FeLV pode ser dividido em quatro subgrupos: A, B, C e T. Destes, apenas o subgrupo A é contagioso; os restantes não são transmitidos entre gatos, mas podem ser gerados “de novo” a partir de mutações e recombinações do subgrupo A e de retrovírus endógenos. De facto, estão presentes no genoma felino retrovírus endógenos não patogénicos que não se replicam e que são transmitidos à descendência. Os gatos infetados em circunstâncias naturais contêm sempre o subgrupo A isoladamente ou em combinação com outro(s) (Dunham & Graham, 2008; MacLachland & Dubovi, 2011; Hartmann, 2012).

A transmissão do FeLV ocorre essencialmente através da saliva de gatos virémicos, na qual a concentração do vírus é muito superior à do sangue. Assim sendo, o FeLV transmite-se de modo horizontal durante comportamentos sociais amigáveis, como o *grooming*, ou agressivos através de mordeduras. Este vírus pode também ser transmitido através da partilha de comedouros e bebedouros, apesar desta via se encontrar limitada a gatos em estreito contacto social devido à baixa resistência viral no ambiente. A infeção por FeLV também pode

ser transmitida verticalmente, por via transplacentária, em gatas gestantes virêmicas, dando origem a reabsorção fetal, nados-mortos ou morte neonatal; porém, cerca de 20% dos gatinhos podem sobreviver ao período neonatal e tornar-se persistentemente infetados. Apesar disto, é geralmente através dos cuidados maternos que os gatinhos adquirem a infecção (quando a mãe realiza o seu *grooming*) (Dunham & Graham, 2008; MacLachland & Dubovi, 2011; Hartmann, 2012).

A evolução da infecção por FeLV é muito variável, dependendo de fatores como a idade e o sistema imunitário do animal, a carga viral infetante e a presença de comorbilidades (Dunham & Graham, 2008). Após exposição, ocorre replicação viral no tecido linfoide da orofaringe e, dependendo da eficácia da resposta imunitária montada, o desfecho da infecção difere podendo esta ser classificada em abortiva, regressiva, progressiva e focal/atípica (Hartmann, 2012).

A infecção abortiva é relativamente rara e caracteriza-se pelo desenvolvimento de uma resposta imunitária humoral e celular eficaz que consegue conter a replicação viral e, como tal, não ocorre uma fase de virémia. Esta forma está muito associada a indivíduos imunocompetentes expostos a baixa dose viral que, por isso, demonstram um título de anticorpos neutralizantes elevado com resultados negativos na pesquisa de antigénio no sangue. Contudo, estudos recentes demonstraram que nestes gatos o vírus pode ser detetado numa fase mais tardia, o que explica a deteção dos anticorpos passados vários anos após a infecção. Como tal, questiona-se, hoje, se estes gatos são realmente capazes de eliminar completamente a infecção por FeLV (Hartmann, 2012).

Na infecção regressiva ocorre uma fase de virémia transitória na qual o vírus se dissemina para tecidos alvo, entre os quais o timo, baço, linfonodos e glândulas salivares. Na maioria dos gatos a virémia mantém-se geralmente por apenas 3-6 semanas (máximo de 16 semanas), durante a qual os gatos excretam o vírus e este pode ser detetado no sangue. No entanto, os animais conseguem montar uma resposta imunitária eficaz que impede a replicação viral e elimina a virémia antes ou logo após a infecção da medula óssea. Estes gatos deixam, então, de produzir partículas virais, pelo que o hospedeiro não representa uma fonte de contágio. Porém, quando a virémia persiste por um longo período de tempo de tal modo que permite o estabelecimento da infecção na medula óssea, ocorre integração do provírus no genoma das células estaminais e, como tal, os animais deixam de ser capazes de eliminar a infecção, mesmo controlando a virémia – estado de latência – não havendo replicação viral. Apesar de pouco comum, a infecção pode ser reativada espontaneamente ou devido a um estado de imunossupressão (Hartmann, 2012).

Em gatos com infecção progressiva, a resposta imunitária desenvolvida não é suficiente e, como tal, a virémia mantém-se por mais de 16 semanas e os gatos tornam-se persistentemente virêmicos e contagiosos para os gatos suscetíveis. Naturalmente, o título de anticorpos neutralizantes nestes animais é baixo, apesar de haver replicação viral persistente

na medula óssea, baço, linfonodos e glândulas salivares. Os gatos jovens e imunodeprimidos são os que se encontram em maior risco de desenvolver infecção progressiva e doenças associadas ao FeLV que, geralmente, são causa de mortalidade dentro de 3 anos. Numa fase inicial a infecção progressiva é indistinguível da regressiva, mas estas podem ser diferenciadas pela repetição de testes que detetam a virémia (Hartmann, 2012).

A infecção focal ou atípica raramente é observada em condições naturais e caracteriza-se pela replicação viral em locais atípicos, nomeadamente nas glândulas mamárias, bexiga e olhos. Neste tipo de infecção ocorre uma produção intermitente e baixa de antigénio que pode ser responsável pela obtenção de resultados discordantes (Hartmann, 2012).

As consequências mais comuns associadas à infecção por FeLV consistem no desenvolvimento de neoplasias, alterações hematológicas, imunossupressão e doenças imunomediadas (Lutz et al., 2009).

Relativamente às neoplasias, o FeLV está frequentemente envolvido na génese de linfomas e leucemias agudas, apesar de também poder causar neoplasias não hematopoiéticas. Este efeito deve-se à inserção do genoma viral numa região próxima de um oncogene, o que resulta na sua ativação e expressão, ou devido a recombinações no FeLV-A que culminam na integração de um oncogene. Na prática clínica, o linfoma é a neoplasia que surge mais comumente associada ao FeLV, sendo geralmente de células T (Dunham & Graham, 2008; Hartmann, 2012). Em relação à localização anatómica, tem-se verificado que o linfoma mediastínico (comum em gatos jovens) é a forma que mais se encontra associada ao FeLV, sendo este agente viral detetado em 80-90% dos casos. Já no linfoma multicêntrico, está descrito que 50% dos gatos são positivos ao FeLV, ao passo que no linfoma intestinal apenas 25-30% dos casos se encontram associados a esta infecção (Hartmann, 2012). Um estudo efetuado no linfoma extranodal felino mostra que, dos 149 gatos incluídos, apenas foi detetado o antigénio FeLV em 4 (Taylor et al., 2009), enquanto que num estudo incidente especificamente no linfoma nasal 5 dos 51 gatos eram positivos ao FeLV (Haney et al., 2009). No entanto, como referido, a prevalência de FeLV tem diminuído na população felina; contudo, a incidência de linfoma nesta espécie tem aumentado (particularmente em gatos geriátricos), o que permite concluir que nos dias de hoje a maioria dos linfomas em gatos não se encontram associados ao FeLV (Dunham & Graham, 2008; Hartmann, 2012). A leucemia aguda é também uma neoplasia frequente que se encontra em gatos FeLV-positivos, estando estimado que está presente em mais de 50% dos gatos infetados. Apesar de envolver frequentemente as células linfoides, todas as linhagens hematopoiéticas são suscetíveis e, como tal, podem também ocorrer leucemias mieloides. Independentemente do tipo, na leucemia aguda a medula óssea fica preenchida com células blásticas e a hematopoiese encontra-se suprimida (Hartmann, 2012).

De entre as alterações hematológicas, é frequente encontrar anemia não regenerativa (associada ao subgrupo C ou como resultado de doença crónica), apesar de uma anemia

regenerativa também poder ser notada devido a fenómenos hemolíticos secundários a infeção por *Mycoplasma* spp. ou a um mecanismo imunomediado. Concomitantemente, podem estar presentes outras citopénias como linfopénia (resultante da replicação viral em linfócitos), neutropénia e trombocitopénia (causadas por mecanismos imunomediados induzidos pelo vírus ou hipoplasia medular) (Lutz et al., 2009; Hartmann, 2012). A linfopénia, caracterizada por uma depleção preferencial de linfócitos CD4+, e a neutropénia, conjugadas com atrofia do timo e disfunção dos neutrófilos remanescentes, culminam num estado de imunossupressão que, regra geral, é mais grave que a causada pelo FIV. Com o sistema imunitário debilitado, os animais tornam-se mais suscetíveis a infeções secundárias e ao desenvolvimento de gengivoestomatite e rinite crónicas (Lutz et al., 2009). Os gatos infetados com FeLV tornam-se também mais predispostos ao desenvolvimento de doenças imunomediadas devido à perda de linfócitos-T supressores e à deposição de complexos imunes (Hartmann, 2012).

As técnicas utilizadas hoje em dia no diagnóstico laboratorial do FeLV têm por base a deteção do vírus (um antígeno específico, ARN viral ou ADN proviral) e, como tal, pode ser realizado em qualquer idade. À semelhança do FIV, encontram-se disponíveis testes ELISA e de imunomigração rápida que permitem detetar o antígeno p27 (uma proteína da cápside produzida em grande quantidade por células infetadas) (Dunham & Graham, 2008; Hartmann, 2012). Estes testes permitem encontrar um resultado positivo logo numa fase inicial da infeção, antes da medula óssea ser afetada, e nesta medida a positividade pode refletir a virémia transitória (infeção regressiva) ou a virémia persistente (infeção progressiva) (Hartmann, 2012). No entanto, perante um resultado positivo num animal com baixo risco de exposição, deve ser sempre feita a sua confirmação e para tal é usual recorrer-se a outros métodos como o PCR ou a imunofluorescência (IF) direta. O PCR é uma técnica altamente sensível e permite detetar (PCR convencional) ou quantificar (PCR *real-time*) sequências nucleotídicas virais, seja ARN viral ou ADN proviral, em variadas amostras biológicas (sangue, medula óssea e até saliva). Vários autores sugerem que o PCR é particularmente útil nos gatos com infeção latente, tendo em conta que testam negativo na deteção de antígeno, mas positivo na pesquisa de provírus. Por sua vez, a IF deteta a p27 em células infetadas, podendo ser feita em esfregaços sanguíneos ou de medula óssea (Dunham & Graham, 2008).

Quando alcançado o diagnóstico de FeLV, devem ser adotadas medidas de manejo específicas, nomeadamente o isolamento destes gatos de modo a evitar o contacto com outros não infetados, a castração dos gatos inteiros, o fornecimento de uma boa alimentação, assim como a realização de exames médicos regulares (de preferência a cada 6-12 meses). Devem ser ainda instituídas medidas terapêuticas de suporte (fluidoterapia, transfusões sanguíneas, antibioterapia no caso de infeções secundárias e quimioterapia na abordagem ao linfoma) quando surgem as típicas doenças associadas ao FeLV. A administração de antivirais e imunomoduladores está também descrita, apesar de existirem poucos estudos controlados que comprovem a sua eficácia (Lutz et al., 2009; Hartmann, 2012). Porém,

recentemente, têm sido conduzidos trabalhos no sentido de avaliar o raltregavir (um antiviral com ação em gamaretrovírus), com resultados *in vitro* e *in vivo* que demonstram o seu potencial terapêutico (Cattori, Weibel & Lutz, 2011; Boesch et al., 2014). Apesar da esperança média de vida de gatos com FeLV ser baixa, estas medidas têm permitido registar um aumento na sua sobrevivência (Hartmann, 2012).

Dada a gravidade da doença causada pelo FeLV, as medidas de prevenção revestem-se de uma importância incomparável, sendo evidente que a sua adoção tem permitido diminuir a prevalência desta infeção. Por um lado, a realização de testes de despiste tem permitido detetar gatos positivos cada vez mais precocemente e, desta forma, minimizar o contágio. Hoje em dia defende-se que o estatuto em relação ao FeLV deve ser conhecido em todos os gatos. Por outro lado, encontram-se disponíveis vacinas contra o FeLV consideradas “não-essenciais” que, como tal, apenas são recomendadas em gatos que apresentam risco de exposição (Hartmann, 2012). A primovacinação consiste numa dose inicial em gatinhos com 8 semanas e uma segunda dose passadas 3-4 semanas. Posteriormente, é recomendado um reforço passado um ano com revacinações a cada 2-3 anos (Day et al. 2015).

2.2.4. Erliquiose monocítica canina

A erliquiose monocítica canina (EMC) é uma doença transmitida por vetores causada pelo agente *Ehrlichia canis*, uma bactéria Gram-negativa intracelular obrigatória com tropismo para monócitos e macrófagos, nos quais aparece sob a forma de agregados a que se atribui a designação de mórula. A *E. canis* infeta membros da família Canidae, sendo transmitida por vetores ixodídeos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*. Apesar da distribuição mundial, a EMC ocorre essencialmente em zonas tropicais e temperadas (Seixas, Alho, Guerra & Madeira de Carvalho, 2011; Harrus, Waner & Neer, 2012). Um estudo realizado a nível nacional com o objetivo de determinar a seroprevalência de várias doenças transmitidas por vetores verificou a presença de anticorpos contra *E. canis* em 4,1% da amostra de cães clinicamente saudáveis e em 16,4% da amostra de cães suspeitos de deterem uma destas doenças. Para além disto, neste mesmo estudo foi também possível concluir que a seropositividade foi superior no sul de Portugal (particularmente no Algarve e Alentejo), em detrimento do norte e centro do país (Cardoso, Mendão & Madeira de Carvalho, 2012).

O ixodídeo *R. sanguineus* é de três hospedeiros e adquire a *E. canis* durante o estadio de larva ou ninfa, aquando da refeição sanguínea num canídeo infetado. O modo de transmissão é transestadial (na qual a infeção é transmitida para os estadios subsequentes), não se verificando transmissão transovárica para a geração seguinte. A infeção em cães suscetíveis surge quando a carraça faz nova alimentação e contamina o local da picada com as secreções salivais, as quais veiculam o agente (Harrus et al., 2012). O facto da picada estimular a migração das células mononucleares ao local da inoculação parece acelerar a infeção (Seixas et al., 2011).

Após um período de incubação de 8-20 dias, a evolução clínica da doença pode ser dividida em três fases – aguda, subclínica e crónica. A fase aguda pode durar entre 1 a 4 semanas e caracteriza-se pelo aparecimento dos sinais clínicos, nomeadamente letargia, anorexia, perda de peso, linfadenomegália, febre, petéquias, equimoses, hemorragias e alterações oculares. Caso a doença não seja detetada ou corretamente abordada, evolui para uma fase subclínica em que o hospedeiro se torna portador assintomático, situação que se pode manter por meses ou até anos. Nesta fase, os indivíduos imunocompetentes podem conseguir eliminar a infeção e recuperar espontaneamente; os que não o conseguem progridem para a fase crónica, associada a mortalidade elevada e que se caracteriza pelo aparecimento de pancitopénia grave resultante de hipoplasia medular (Harrus et al., 2012). Os mecanismos responsáveis por esta mielossupressão ainda não se encontram compreendidos, sabendo-se apenas que a mielofibrose não é um fator significativo, tendo em conta resultados de biópsias medulares efetuadas (Mylonakis, Day, Siarkou, Vernau & Koutinas, 2009). Apesar de não se registar predisposição racial, o Cão de Pastor Alemão parece ser particularmente suscetível à *E. canis*, exibindo sinais mais graves e uma taxa de mortalidade superior, possivelmente devido a uma resposta imunitária celular menos expressiva (Harrus et al., 2012).

O diagnóstico de EMC pode ser feito através da visualização das mórulas nos monócitos, em esfregaços sanguíneos totais ou apenas da camada leucocitária (*buffy-coat*), ou ainda em macrófagos obtidos a partir de punção aspirativa de tecidos; no entanto, este método é pouco sensível. Nesta medida, é comum recorrer-se a testes de diagnóstico, considerados de primeira abordagem, que se baseiam na pesquisa de anticorpos por IF indireta ou ELISA (Harrus et al., 2012). De modo geral a seroconversão ocorre 7 dias após a exposição, mas pode demorar até 28 dias (Neer, 2003). Contudo, está descrita a ocorrência de reatividade cruzada com outras espécies do género *Ehrlichia* sp. e com microrganismos filogeneticamente próximos, como é o caso do *Anaplasma* sp.. Os resultados obtidos devem, por isto, ser interpretados em conjunto com a localização geográfica, a anamnese e o quadro clínico do doente (Alexandre et al., 2008; Harrus et al., 2012). Quando necessário, podem ser utilizadas outras técnicas, nomeadamente o *Western blot* e o PCR, que permitem caracterizar e distinguir a espécie envolvida e, por conseguinte, esclarecer potenciais reações cruzadas (Neer, 2003). Alexandre et al. (2008) realizaram o primeiro estudo em Portugal que visou detetar a *E. canis* através do PCR em 55 cães, tendo verificado que 12 destes eram positivos. Para além disto, efetuaram concomitantemente a técnica de IF, sendo que em 7 destes 12 cães não se detetaram anticorpos. Tendo em conta que o PCR deteta o ADN a partir do quarto dia pós-infeção, os autores reforçam assim o pressuposto de que as técnicas serológicas e moleculares devem ser utilizadas em conjunto de modo a obter um diagnóstico precoce. O facto da sensibilidade do PCR a partir de amostras de sangue não ser suficientemente elevada é um dos fatores que tem limitado a sua utilização como único teste de diagnóstico. Porém, o PCR *real-time* é mais sensível que o método convencional e providencia resultados

quantitativos, pelo que a sua importância tem vindo a aumentar no diagnóstico de várias doenças (Harrus et al., 2012).

A terapêutica da EMC consiste na instituição de cuidados de suporte e antibioterapia, sendo as tetraciclina bastante eficazes. Destas, a doxiciclina é a considerada o fármaco de eleição, pois, por ser lipossolúvel, penetra no meio intracelular de modo a eliminar a infeção; no entanto, é requerido um período terapêutico prolongado (21-28 dias). Apesar do cloranfenicol se encontrar recomendado em cachorros com menos de 5 meses, nos quais se evita a utilização de tetraciclina devido à descoloração dentária, vários autores defendem, tendo em conta os seus efeitos adversos e o impacto da sua utilização na saúde pública, que este deve ser reservado para os casos refratários à doxiciclina. Quando a terapêutica é instituída na fase aguda, a maioria dos animais consegue recuperar, registando-se melhorias clínicas em 24-48 horas. Quando a fase crónica já se encontra instalada, de modo geral os cães não respondem ao tratamento, não se verificando melhorias significativas nas alterações clínicas e laboratoriais, pelo que o prognóstico nestes animais é grave (Harrus et al., 2012).

Quando atingida a recuperação, os cães não parecem adquirir imunidade pelo que podem ser reinfetados, estando em maior risco aqueles que se encontram em áreas endémicas. Como tal, é importante sensibilizar os proprietários em relação às medidas preventivas, nomeadamente o rigoroso controlo dos vetores ixodídeos (Harrus et al., 2012).

2.2.5. Mielossupressão induzida por fármacos

A mielossupressão é uma reação adversa bem conhecida de diversos fármacos, afetando a produção das células hemáticas, que se manifesta no sangue periférico pelo aparecimento sequencial de leucopénia, trombocitopénia e, em casos prolongados, anemia (Carey, 2003; Bailey, 2014).

Os compostos quimioterápicos citotóxicos representam o grupo de fármacos mais comumente associado a mielossupressão devido à sua toxicidade sobre a medula óssea (tabela 3), uma vez que atuam preferencialmente em células com grande atividade mitótica e não exibem seletividade específica contra células tumorais, podendo, pois, afetar de igual modo as células normais do organismo (Carey, 2003; Weiss, 2012; Bailey, 2014).

Tabela 3: Classificação dos fármacos antineoplásicos em função do risco para induzir mielotoxicidade. Adaptado de Frimberger e Moore, 2009; Weiss, 2012.

Alto	Moderado	Baixo - Nulo
<ul style="list-style-type: none">• Carboplatina• Ciclofosfamida• Citarabina• Doxorubicina• Lomustina• Vinblastina	<ul style="list-style-type: none">• Cisplatina• Clorambucil• Metotrexato• Vincristina• 5-Fluoruracilo	<ul style="list-style-type: none">• L-asparaginase• Bleomicina

Como tal, as células precursoras presentes na medula óssea, por apresentarem índices mitóticos elevados, são intrinsecamente mais sensíveis à ação dos quimioterápicos. Esta é uma reação adversa de tipo A ou I, ou seja, que afeta a generalidade da população, é dose-dependente e previsível (Carey, 2003; Weiss, 2012; Bailey, 2014). Assim sendo, por ser um fenómeno expectável, imediatamente antes de qualquer administração de um quimioterápico, é fundamental que se efetue um hemograma, estando advogado que se a contagem de neutrófilos for inferior a $3,00 \times 10^3/\mu\text{l}$ a sessão deva ser protelada por 3-7 dias (Frimberger, 2011). Para além disto, sabendo-se à partida que a contagem de neutrófilos decai nos dias subsequentes à sua administração, atingindo o seu mínimo (nadir) entre os 5-10 dias, é recomendada a realização de um novo hemograma passados 7 dias e, caso o valor absoluto de neutrófilos seja inferior a $1,00 \times 10^3/\mu\text{l}$, é necessário reduzir a dose em 10-25% na sessão seguinte (Brewer, 2003; Frimberger, 2011; Bailey, 2014).

Atualmente a utilização profilática de antimicrobianos no doente oncológico é uma temática controversa tanto em medicina veterinária, como em medicina humana. Nos últimos anos tem-se registado um aumento preocupante na incidência de resistências bacterianas e, como tal, têm surgido inúmeras vozes que defendem o uso prudente e racional destes fármacos (Boudreaux, 2014). Deste modo, em oncologia humana a prescrição de antimicrobianos de forma profilática não está recomendada como procedimento de rotina (Carey, 2003), encontrando-se restringida aos doentes com neutropénia que apresentam um risco aumentado de desenvolver sépsis após a quimioterapia (Boudreaux, 2014). Já em medicina veterinária, tradicionalmente era recomendada a instituição de antibioterapia de largo espetro por via PO após a administração de um quimioterápico a todos os animais e, ainda hoje, muitos autores defendem esta medida terapêutica (Frimberger & Moore, 2009; Frimberger, 2011; Bailey, 2014). No entanto, têm sido realizados esforços no sentido de criar uma nova abordagem, semelhante à de medicina humana, que consiste em identificar os doentes oncológicos em risco de desenvolver neutropénia e sépsis, prescrevendo antimicrobianos apenas a esses (Boudreaux, 2014). Com este objetivo, foi publicado um estudo que pretendeu determinar eventuais fatores de risco que possam estar associados ao desenvolvimento de sépsis em animais a receber quimioterapia, tendo-se verificado que cães com baixa condição corporal, com neoplasias hematopoiéticas, com protocolo quimioterápico que inclui a utilização de doxorubicina e vincristina e que se encontram na fase de indução são os que apresentam maior risco de desenvolver sépsis (Sorenmo, Harwood, King & Drobatz, 2010). Outra molécula muito associada a depressão da medula óssea é a azatioprina, um fármaco imunossupressor utilizado no manejo de afeções imunomediadas no cão, estando particularmente descrita a sua utilização terapêutica em casos de anemia hemolítica, trombocitopénia, doenças cutâneas e enteropatias imunomediadas e na miastenia gravis (Gregory, 2014). A azatioprina raramente é utilizada em monoterapia, sendo na maior parte das vezes adicionada a um protocolo terapêutico já existente quando a dose de

corticosteróide é insuficiente ou está a causar efeitos secundários exacerbados. Os gatos parecem ser particularmente sensíveis a este fármaco devido a uma deficiência enzimática envolvida na sua metabolização, sendo desencadeada uma mielossupressão grave, pelo que a sua administração está contraindicada nesta espécie (Weiss, 2012, Ramsey, 2014). Quando a azatioprina é administrada em cães são feitas recomendações no sentido de realizar hemogramas para monitorização ao longo do tratamento, nomeadamente a cada 1-2 semanas durante o período inicial e, posteriormente, a cada 1-2 meses, quando atingida a dose de manutenção (Ramsey, 2014). Em casos de leucopénia grave, a azatioprina deve ser descontinuada de imediato, retornando os valores hematológicos ao normal (Weiss, 2012).

A mielossupressão pode também ser resultado de reações idiossincráticas, classificadas como reações adversas de tipo B ou II. Por definição, estas são acontecimentos raros, imprevisíveis, independentes da dose e que geralmente afetam apenas uma pequena proporção da população (estando associadas a uma suscetibilidade individual). Dada a clara dificuldade em estabelecer uma relação causa-efeito, representam um autêntico desafio no seu diagnóstico (Trepanier, 2013). Em medicina veterinária, já foi descrito que os fármacos fenobarbital, fenilbutazona, carprofeno, sulfamidas, griseoflúvina, captopril, metronidazol e colchicina são capazes de induzir mielossupressão através deste tipo de reação (Weiss, 2012).

Apesar do mecanismo de ação tóxica não se encontrar completamente esclarecido, pensa-se que o fenobarbital, um anticonvulsivo de primeira linha bastante utilizado, pode causar mielonecrose em alguns cães após uma terapêutica crónica (Weiss, 2005, 2012). Jacobs, Calvert e Kaufman (1998) descreveram a ocorrência desta idiossincrasia em três cães que desenvolveram pancitopénia após 2 meses de iniciar o tratamento com fenobarbital e, de modo semelhante, Jung, Kang e Park (2015) referem um caso de uma cadela que se apresentou com pancitopénia 7 semanas depois desta terapêutica. Após a descontinuação do fármaco verifica-se que a medula óssea pode demorar 3-8 semanas a recuperar (Weiss, 2012; Jung et al., 2015).

A terapêutica com fenilbutazona, um anti-inflamatório não esteroide (AINE), também já foi associada ao desenvolvimento de pancitopénia, que tanto pode ocorrer duas semanas após a sua instituição, como meses ou anos depois da sua administração. Na primeira situação estão envolvidos mecanismos imunomediados e a supressão da divisão celular, enquanto o uso crónico é responsável por mielonecrose. O carprofeno é outro AINE que já foi associado à ocorrência de necrose da medula óssea em cães, tendo causado repercussões hematológicas (citopénias) que recuperaram espontaneamente com a sua suspensão (Weiss, 2005, 2012).

Os antimicrobianos do grupo das sulfamidas podem também causar pancitopénia 10-14 dias após o início do tratamento, verificando-se substituição da medula óssea por tecido adiposo, apesar de também poderem estar presentes mecanismos imunomediados (Weiss, 2012).

Já o antifúngico griseofulvina causa reações idiossincráticas em gatos, as quais se caracterizam pela ocorrência de neutropenia ou panleucopenia várias semanas após o início da terapêutica, apresentando-se a medula óssea destes animais hipoplásica (Weiss, 2012). Outros trabalhos científicos afirmam que a administração contínua de captopril durante 18 meses causou aplasia medular num cão (Holland, Stobie & Shapiro, 1996) e que o metronidazol e a colchicina se encontram associados a mielonecrose nalguns animais (Weiss, 2005, 2012).

Apesar de no homem o cloranfenicol ser responsável por uma mielossupressão grave e irreversível de forma idiossincrática, em cães e gatos esta reação adversa reveste-se de menor importância, sendo reversível e dose-dependente (tipo A ou I), ocorrendo quando se ultrapassa largamente a dose terapêutica (Weiss, 2012; Plumb, 2015).

2.2.6. Afeção primária da medula óssea

O termo mieloptose refere-se à substituição do tecido hematopoiético da medula óssea por tecido anormal, o que resulta não só na destruição de células precursoras, mas também do estroma medular responsável por fornecer um microambiente adequado à maturação e diferenciação destas células. Diversas doenças podem ser, primariamente, responsáveis por este fenómeno, entre as quais neoplasias, mielofibrose e osteopetrose (Claus, 2015).

As neoplasias com sede na medula óssea podem ter origem hematopoiética (denominadas leucemias) ou não hematopoiética, as quais incluem sarcomas como o condrossarcoma e o osteossarcoma (Allison, 2010). As leucemias podem desenvolver-se a partir da linhagem celular mieloide ou linfóide, sendo ainda classificadas em agudas ou crónicas, consoante o grau de diferenciação das células neoplásicas e a evolução clínica. Nesta medida, nas leucemias agudas as células neoplásicas são essencialmente imaturas e pouco diferenciadas (sendo caracterizadas pela presença de células blásticas na medula óssea numa percentagem igual ou superior a 20%) e encontram-se associadas a um curto período de sobrevivência após o diagnóstico. Já nas leucemias crónicas é verificada uma predominância de células neoplásicas maduras e com algum grau de diferenciação, com maior tempo de sobrevivência do doente (Thrall, 2012). O leucograma de animais com leucemia é bastante variável, podendo observar-se leucocitose, leucopenia ou até contagens celulares dentro dos valores de referência (Tvedten & Raskin, 2012). No entanto, está descrito que a ocorrência de anemia, neutropenia e trombocitopenia são achados laboratoriais mais frequentes e tendencialmente mais graves nas leucemias agudas comparativamente às crónicas (Thrall, 2012). A medula óssea pode ainda ser afetada por infiltração metastática de tumores primários, de que são exemplo os carcinomas (Allison, 2010).

A síndrome mielodisplásica primária, considerada um estadio pré-leucémico, é uma afeção associada a defeitos qualitativos na medula óssea que resultam de mutações genéticas adquiridas nas células estaminais hematopoiéticas. Apesar da celularidade medular se

apresentar normal ou mesmo aumentada, a hematopoiese encontra-se alterada, o que se repercute na produção de células morfológicamente anormais que são destruídas por indução de apoptose antes de serem libertadas na circulação. Deste modo, o diagnóstico é feito com base na presença de várias citopénias no sangue periférico e um aumento concomitante nas células blásticas em aspirados medulares, mas numa percentagem inferior a 20%, com alterações displásicas celulares notáveis (Allison, 2010; Weiss & Tvedten, 2012).

A mielofibrose consiste na substituição do tecido da medula óssea por tecido conjuntivo fibroso devido a uma proliferação de fibroblastos associada a deposição de colagénio. A mielofibrose é comumente secundária a várias doenças, entre as quais mielonecrose, anemia hemolítica imunomediada e exposição a radiação, sendo que tradicionalmente não se considerava a existência de mielofibrose primária nos animais de companhia. Porém, têm surgido casos relatados de mielofibrose idiopática, também denominada metaplasia mioide e mioesclerose, em cães e gatos, tendo sido sugerido que na sua patogenia está uma displasia megacariocítica, na qual megacariócitos e plaquetas atípicos produzem fatores de crescimento que estimulam a proliferação de fibroblastos (Reagan, 1993; Weiss & Smith, 2002).

A osteopetrose é uma doença óssea metabólica hereditária rara que já foi descrita no cão e no gato, sendo caracterizada por um defeito na reabsorção óssea pelos osteoclastos. Como consequência, ocorre um aumento generalizado da densidade óssea, ficando a cavidade medular preenchida por tecido ósseo, o que prejudica a hematopoiese (Tolar, Teitelbaum & Orchard, 2004; Mendes Neto et al., 2013).

2.2.7. Hiperestrogenismo

Na espécie canina vários estudos evidenciam os efeitos mielotóxicos induzidos pelos estrogénios, podendo a exposição a esta hormona estar associada a processos de origem endógena (nomeadamente, o sertolinoma em machos e tumores ováricos em fêmeas) e exógena através da administração de análogos para manejo de certas afeções ou da sua ingestão accidental. No entanto, é de notar que, devido aos seus efeitos secundários e ao aparecimento de alternativas mais atrativas, a utilização terapêutica dos estrogénios tem decaído. A sensibilidade aos estrogénios parece ser individual, tendo em conta que animais sujeitos à mesma dose podem exibir apenas sinais ligeiros, ao passo que noutros a mielossupressão pode ser fatal (Sontas, Dokuzeylu, Turna & Ekici, 2009). Já os gatos parecem ser relativamente resistentes aos efeitos que o hiperestrogenismo exerce sobre a medula óssea (Kearns & Ewing, 2006).

O mecanismo pelo qual os estrogénios induzem depressão da medula óssea ainda não se encontra completamente definido, havendo opiniões divergentes sobre esta questão. Alguns autores sugerem que se deve a uma destruição das células hematopoéticas estaminais

(Weiss, 2012), enquanto que outros afirmam que estas não são afetadas, ocorrendo sim produção de um fator inibidor da mielopoiese (Sontas et al., 2014; Claus, 2015).

Aquando de exposição crónica, os machos podem exibir síndrome de feminização caracterizada por ginecomastia, alopecia simétrica bilateral e hiperpigmentação da zona inguinal. No caso particular do hiperestrogenismo causado por sertolinoma, deve ser investigada a possibilidade de criptorquidismo. Em fêmeas, o hiperestrogenismo não é clinicamente expressivo, podendo apenas estar associado a uma fase de estro persistente (Kearns & Ewing, 2006). A nível hematológico, os cães afetados desenvolvem uma resposta inicial caracterizada por leucocitose que, contudo, é seguida por mielossupressão com consequente anemia não regenerativa, leucopenia e trombocitopenia. Os resultados citológicos do aspirado medular são concordantes com estes achados, revelando uma hipocelularidade de todas as linhagens (Sontas et al., 2014).

A terapêutica a instituir nestes casos vai depender da etiologia subjacente e consiste na remoção da fonte dos estrogénios. Contudo, a recuperação é longa e exige cuidados de suporte intensivos para minimizar as consequências da pancitopenia, entre as quais transfusões sanguíneas e antibioterapia. Em cães não tratados, o prognóstico torna-se pouco favorável, dado que os animais tendem a morrer de complicações relacionadas com hemorragias e infeções secundárias (Sontas et al., 2014).

2.2.8. Hematopoiese cíclica do *Collie* cinzento

A hematopoiese cíclica é uma doença hereditária transmitida de forma autossómica recessiva que se encontra em cães das raças *Collie* de Pêlo Comprido e *Collie* de Pêlo Curto com pelagem cinzenta, sendo causada por uma mutação de inserção no gene AP3B1. O mecanismo pelo qual esta mutação é responsável pela patogenia da doença ainda não se encontra esclarecida, mas tem sido proposto que prejudica o transporte intracelular da enzima elastase neutrofílica que, entre outras funções, parece participar na regulação da granulopoiese. A hematopoiese cíclica caracteriza-se então pelo aparecimento de uma neutropenia grave com cerca de 2-4 dias de duração, a qual ocorre a cada 11-14 dias (Rothrock, 2014; Claus, 2015).

A doença é geralmente detetada precocemente, às 4-6 semanas de idade, devido a episódios de infeções recorrentes. A predisposição rácica e o facto destes cachorros serem tipicamente os mais pequenos e fracos da ninhada auxiliam no diagnóstico (Rothrock, 2014).

Nestes animais, o prognóstico é reservado, tendo em conta que a maioria sucumbe poucas semanas após o nascimento. No entanto, com os cuidados de suporte adequados, nomeadamente monitorizações hematológicas regulares e tratamento de eventuais infeções secundárias, alguns animais podem atingir os 2-3 anos de idade (Rothrock, 2014). Com o objetivo de efetuar avanços na doença equivalente em humanos, foi testado num *Collie* cinzento com hematopoiese cíclica o transplante alogénico de medula óssea, tendo-se

verificado um resultado bastante positivo com recuperação da granulopoiese (Dale & Graw, 1974). Todavia, esta abordagem é dispendiosa e encontra-se pouco disponível em medicina veterinária (Rothrock, 2014).

2.3. Neutropénia imunomediada

A destruição imunomediada de neutrófilos é uma causa relativamente rara de neutropénia que pode afetar cães (McManus, Litwin & Barber, 1999; Brown & Rogers, 2001b; Vargo, Taylor & Haines, 2007). A neutropénia imunomediada (NIM) pode ser primária (ou idiopática) ou ocorrer secundariamente a processos de etiologia infecciosa, neoplásica ou após administração de fármacos e, de modo geral, tende a causar uma neutropénia grave com contagens inferiores a $0,50 \times 10^3$ neutrófilos/ μ l (Brown et al., 2006; Nibblett & Carr, 2007; Vargo et al., 2007).

A fisiopatologia desta doença tem por base a destruição de neutrófilos circulantes e/ou dos seus precursores na medula óssea devido à produção de anticorpos contra antígenos específicos na membrana dos neutrófilos. Atualmente, sabe-se que estes antígenos surgem no estadió de mielócito, aumentando o seu número à medida que a maturação dos neutrófilos progride. Como consequência, ocorre opsonização destas células com posterior remoção pelo sistema monocítico-macrofágico no baço, fígado, linfonodos e medula óssea. A trombocitopénia ocorre concomitantemente em cerca de 25% dos cães com NIM e, nestes casos, suspeita-se que os anticorpos são dirigidos contra antígenos inespecíficos presentes em mais que uma célula hemática (Vargo et al., 2007).

A maioria dos animais afetados é assintomática; no entanto, alguns exibem sinais clínicos pouco específicos, entre os quais febre persistente, anorexia e letargia (McManus et al, 1999; Brown et al., 2006; Nibblett & Carr, 2007; Vargo et al., 2007).

O diagnóstico definitivo de NIM requer a demonstração da presença de anticorpos anti-neutrófilos e, como tal, nos casos clínicos descritos têm sido utilizados testes de leucoaglutinação, IF indireta e citometria de fluxo para a sua deteção (McManus et al, 1999; Vargo et al., 2007). Porém, estes testes não são exequíveis em todos os laboratórios e a sua validade em medicina veterinária é ainda escassa. Desta forma, o diagnóstico de NIM é feito com base na exclusão das outras causas de neutropénia, na avaliação citológica da medula óssea e na resposta favorável à terapêutica (Brown et al., 2006; Nibblett & Carr, 2007; Vargo et al., 2007). Na citologia medular poderá, então, ser observada uma hiperplasia granulocítica, como resposta compensatória à destruição dos neutrófilos circulantes, ou hipoplasia granulocítica quando os anticorpos são dirigidos contra as células precursoras na medula óssea (Brown et al., 2006; Vargo et al., 2007).

A terapêutica consiste essencialmente em promover um estado de imunossupressão e, para tal, é comum recorrer-se à administração de corticosteróides e, nalguns casos, à sua associação com azatioprina após ponderação do risco-benefício (Vargo et al., 2007). De

acordo com vários autores, é expectável que ocorra um aumento na contagem de neutrófilos poucos dias após o início do tratamento (McManus et al., 1999; Brown et al., 2006; Vargo et al., 2007), podendo, no entanto, tal demorar três semanas (Nibblett & Carr, 2007). Aquando da estabilização da doença, deve ser tentada uma redução gradual das doses terapêuticas de modo a determinar a dose mínima de manutenção (Nibblett & Carr, 2007; Vargo et al., 2007).

Apesar de esta ser uma afeção até recentemente associada exclusivamente a cães, já foi relatado um caso de NIM primária num gato de 18 meses que apresentava episódios de febre, letargia e neutropénia persistente (sem desvio à esquerda) ao longo de 8 meses. Como mencionado para os cães, o diagnóstico deste caso foi feito por exclusão das outras causas de neutropénia, pelos resultados compatíveis obtidos na citologia da medula óssea (hipoplasia da linhagem neutrofílica, com ausência de neutrófilos maduros e raras células precursoras) e pela resposta positiva, a curto e a longo prazo, à terapêutica imunossupressora (Waugh, Scott & Bryan, 2014).

3. Fator estimulador de colónias de granulócitos

Como previamente referido, o G-CSF é uma das inúmeras citocinas endógenas que intervêm na leucopoiese, sendo específico da linhagem neutrofílica. A ação biológica do G-CSF é de tal modo relevante na produção destas células que mutações aos quais se inativou o gene que o codifica e que, como tal, eram deficientes em G-CSF endógeno, exibiram neutropénia crónica com mobilização disfuncional dos neutrófilos remanescentes (Lieschke et al., 1994). A deficiência em G-CSF endógeno de ocorrência natural também já foi descrita num cão de 3 anos, de raça *Rottweiler*, com neutropénia grave crónica sem causa identificável, não responsiva a imunossupressores e cujo aspirado medular revelava diminuição do rácio M:E e interrupção do processo de maturação dos neutrófilos, havendo apenas 25% de células maduras ao invés dos 80% fisiológicos. Análises realizadas *post mortem* mostraram que a concentração sérica de G-CSF era indetetável, o que é um achado anormal em indivíduos neutropénicos (Lanevski, Daminet, Niemeyer & Lothrop, 1999).

O G-CSF é produzido por várias células, entre as quais macrófagos ativados, células endoteliais e fibroblastos, e atua por ligação a recetores de superfície celular específicos localizados nas células precursoras dos neutrófilos. Desta forma, o G-CSF estimula a proliferação e a diferenciação destas células, mas também apresenta uma ação na redução do tempo de maturação de 5 dias para 1 dia e aumenta a libertação dos neutrófilos maduros presentes no *pool* de armazenamento. O efeito cumulativo de todos estes mecanismos resulta no aumento do número absoluto dos neutrófilos na corrente sanguínea de forma quase imediata. Para além disto, está também descrito que o G-CSF é responsável por um aumento da funcionalidade quimiotática e fagocitária dos neutrófilos (Welte, Gabilove, Bronchud, Platzer & Morstyn, 1996; Cohn et al., 1999).

3.1. Fatores estimuladores de colónias de granulócitos recombinantes humanos

Reconhecendo o seu potencial terapêutico, a indústria farmacêutica desenvolveu moléculas análogas ao G-CSF humano através de engenharia genética, nomeadamente por tecnologia de ADN recombinante. O primeiro G-CSF recombinante humano (rhG-CSF) a aparecer foi o filgrastim (produzido através da inserção do seu gene em células de *E. coli*) seguindo-se-lhe o lenograstim (obtido a partir de células ováricas de hamster chinês). Estas duas proteínas apresentam uma pequena diferença na sua estrutura química, o que lhes confere diferentes propriedades físico-químicas (Welte et al., 1996; Sourgens & Lefrère, 2011; Bolis et al., 2013). No entanto, o filgrastim e o lenograstim apresentam eficácia *in vivo* equiparável (Sourgens & Lefrère, 2011), diferindo essencialmente na sua estabilidade. O filgrastim é instável à temperatura ambiente e a valores de pH fisiológicos; já o lenograstim (à semelhança do G-CSF endógeno) é estável nestas condições (Bolis et al., 2013). Ambos os compostos são eliminados por via renal, apresentando um tempo de semi-vida de 3-4 horas, pelo que a sua posologia requer várias administrações SID (Shah & Welsh, 2014).

Contudo, com o objetivo de obter rhG-CSF de longa ação, foi desenvolvido o pegfilgrastim, que resulta da peguilação (adição de uma molécula de polietilenoglicol) do filgrastim. Ao aumentar a sua massa molecular, verifica-se uma diminuição da sua excreção renal, sendo essencialmente eliminado por enzimas presentes nos neutrófilos. Desta forma, o tempo de semi-vida do pegfilgrastim aumenta para 15-80 horas, sendo assim apenas necessária uma dose (toma única), a qual é equivalente a múltiplas administrações SID de filgrastim ou lenograstim (Shah & Welsh, 2014; Guariglia et al., 2016).

Recentemente surgiu outro rhG-CSF de longa ação, o lipegfilgrastim, que difere do pegfilgrastim no local de inserção da molécula de polietilenoglicol e que apresenta um tempo de semi-vida 5-10 horas superior a este. Tendo em conta ensaios clínicos em humanos, a sua eficácia é equivalente à do pegfilgrastim, só requerendo igualmente uma administração, e é bem tolerado (Guariglia et al., 2016).

O mecanismo de ação dos rhG-CSF tem por base a sua ligação aos recetores do G-CSF endógeno, o que desencadeia uma resposta que mimetiza os seus efeitos biológicos, nomeadamente a produção e libertação de neutrófilos funcionais da medula óssea (Shah & Welsh, 2014). De acordo com o Resumo das Características do Medicamento do Tevagrastim® (substância ativa: filgrastim), no homem ocorre um aumento significativo do número absoluto de neutrófilos no sangue periférico nas primeiras 24 horas após a administração, apresentando os neutrófilos produzidos função normal ou aumentada. Após suspensão da terapêutica, o número de neutrófilos circulantes diminui em 50% em 1-2 dias, retornando aos valores iniciais passados 1-7 dias (*European Medicines Agency [EMA], 2016*). Num estudo efetuado em cães saudáveis submetidos a administrações diárias de filgrastim durante 14 dias observaram-se resultados semelhantes, uma vez que se registou uma subida significativa nos leucócitos totais devido a neutrofilia e, em menor extensão, a monocitose. O

aumento do número absoluto de neutrófilos ocorreu nas primeiras 24 horas após o início do protocolo e, com a descontinuação do rhG-CSF, verificou-se o regresso aos valores basais passados 2-3 dias (Schuening et al., 1989). No entanto, num estudo em que se procedeu à administração diária de uma dose durante 30 dias, observou-se que após o período de neutrofilia inicial, estável e persistente, ocorreu, entre os dias 18-21, um declínio abrupto do número de neutrófilos e que, apesar da suspensão da terapêutica ao dia 30, a neutropénia grave persistiu durante meses, não se verificando alterações nas restantes linhagens celulares. Neste estudo foi ainda realizada titulação de anticorpos anti-rhG-CSF, verificando-se resultados nulos antes do protocolo e um aumento significativo aos dias 14-21 de administração, os quais permaneceram elevados pelo menos dois meses após descontinuação do filgrastim (Hammond et al., 1991).

Com o objetivo de avaliar o efeito do filgrastim na hematopoiese de gatos saudáveis, foi realizado um estudo idêntico ao anterior procedendo-se à administração do fármaco em diferentes doses, duas vezes ao dia durante 21 dias. Como esperado, registou-se um aumento significativo na contagem de neutrófilos periféricos, comparativamente ao controlo, apesar de não se ter verificado uma resposta dependente da dose. A neutrofilia atingiu o seu máximo entre os dias 10-14, sendo que no dia 19 após início da terapêutica os níveis de neutrófilos já tinham diminuído significativamente (Fulton, Gasper, Ogilvie, Boone & Dornsife, 1991).

As observações registadas nestes estudos efetuados em cães e gatos comprovam que, pelo facto da origem dos rhG-CSF ter por base ADN humano, os fármacos testados tornam-se imunogénicos para os animais de companhia quando administrados cronicamente e, como tal, induzem a produção de anticorpos neutralizantes. Porém, está descrito que estes anticorpos são também capazes de interagir com o G-CSF endógeno, o que revela ser um efeito contraproducente. Do mesmo modo que causa neutropénia grave em indivíduos saudáveis, agrava a neutropénia já existente nos indivíduos doentes (Hammond et al., 1991; Plumb, 2015).

3.1.1. Utilização em medicina humana

O filgrastim foi inicialmente utilizado como tratamento adjuvante da quimioterapia e a sua introdução mostrou, deste logo, resultados promissores na área de oncologia e hematologia humana (Welte et al., 1996). Vários estudos têm demonstrado que, em doentes sujeitos a protocolos quimioterápicos mielotóxicos, o filgrastim revelou apresentar um efeito benéfico na redução da gravidade e duração da neutropénia e, conseqüentemente, na diminuição da incidência de infeções secundárias e da morbilidade e mortalidade a elas associadas. De modo indireto, também foi comprovado que reduz a utilização de antibioterapia e o tempo de hospitalização. Paralelamente, ao reduzir um dos principais efeitos adversos inerentes à quimioterapia, permite a instituição de protocolos com dosagens ou frequências superiores

quando se deseja recorrer a abordagens mais intensivas (Crawford et al., 1991; Pentengell et al., 1992; Trillet-Lenoir et al., 1993; Zinzani et al., 1994).

Tendo em conta o custo elevado que a administração profilática de rhG-CSF a todos os doentes oncológicos representaria (Dale, 2002), a Associação Americana de Oncologia Clínica elaborou normas orientadoras que têm sido sujeitas a variadas atualizações, consoante os resultados de estudos clínicos. As recomendações mais recentes advogam que os rhG-CSF devem ser administrados de forma profilática em pessoas com risco de desenvolver neutropénia febril igual ou superior a 20% e em doentes nos quais ocorreram episódios de neutropénia febril em ciclos anteriores (Smith et al., 2015). Para além destas situações, também está indicada a administração de rhG-CSF de forma terapêutica de modo a auxiliar a recuperação da medula óssea quando se instala um episódio de neutropénia (Dale, 2002).

Apesar de raras, as reações adversas idiossincráticas caracterizadas por uma diminuição na produção dos granulócitos representam também uma afeção bem reconhecida em medicina humana. Vários estudos têm avaliado a utilização de rhG-CSF após episódios de neutropénia induzidos por este tipo de reação adversa, estando envolvida uma grande variedade de classes de fármacos (antitiroideos, antimicrobianos, anticonvulsivos e AINEs). Os seus resultados mostram que a administração de rhG-CSF é responsável por uma recuperação mais rápida da contagem dos neutrófilos (Balkin, Buchholtz, Ortiz & Green, 1993; Mani, Barry & Concato, 1993; Tamai et al., 1993; Beauchesne & Shalansky, 1999; Andrès et al., 2001; Andrès et al., 2002; Ibáñez et al., 2008). Para além disto, o uso de rhG-CSF também foi associado a uma menor duração da antibioterapia (que é usual instituir concomitantemente), menores tempos de hospitalização e menos custos (Andrès et al., 2001; Andrès et al., 2002). A utilização de rhG-CSF também já foi avaliada em doentes com infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), os quais podem desenvolver neutropénia devido à progressão da doença e/ou ao uso de antivirais mielossupressores na abordagem terapêutica (Hermans et al., 1996). Nesta medida, vários estudos clínicos realizados com filgrastim demonstraram que este é efetivamente capaz de aumentar o número absoluto de neutrófilos no sangue (revertendo os episódios de neutropénia) e é bem tolerando, não se registando sinais de toxicidade (Kimura et al., 1990; Mueller et al., 1992; Hermans et al., 1996), nem aumento da carga viral plasmática (Kuritzkes et al., 1998). Posteriormente, o filgrastim pode ser utilizado numa abordagem preventiva de modo a preservar a contagem de neutrófilos dentro dos valores de referência através de uma dose mínima de manutenção (EMA, 2016). Ao corrigir a neutropénia, o filgrastim tem também sido associado a uma menor morbidade na medida em que diminui a incidência e duração de infeções oportunistas e, conseqüentemente, as hospitalizações e recurso a antimicrobianos (Kuritzkes et al., 1998). Para além disto, ao garantir uma contagem de neutrófilos aceitável, o uso de rhG-CSF apresenta ainda a vantagem de permitir a continuação da terapêutica antiviral

mielossupressora, sem haver necessidade de redução de doses ou da sua suspensão (Hermans et al., 1996).

Em medicina humana, os rhG-CSF são também administrados comumente como tratamento de suporte em doentes sujeitos a transplantes de medula óssea, pois aceleram a granulopoiese e a recuperação da contagem dos neutrófilos periféricos (Welte et al., 1996). No entanto, como alternativa ao transplante de medula óssea, surgiu o transplante de células progenitoras hematopoiéticas do sangue periférico que tem sido associado a um restabelecimento mais rápido das funções imunitárias, a menor incidência de infecções, a um menor recurso a transfusões de eritrócitos e plaquetas, antibioterapia e cuidados intensivos, o que acaba por culminar em menor morbidade e custos associados. Neste âmbito, os rhG-CSF apresentam aplicabilidade como forma de aumentar a mobilização das células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea para o sangue periférico nos doadores saudáveis previamente à colheita que se realiza, geralmente, 4-5 dias após o início das administrações (Hosing, 2012). Dos rhG-CSF disponíveis, apenas o filgrastim e o lenograstim se encontram autorizados para este uso (Hosing, 2012), requerendo administrações diárias. Contudo, um estudo clínico realizado com pegfilgrastim mostrou que este é igualmente eficaz a mobilizar as células progenitoras hematopoiéticas para o sangue periférico, sendo apenas necessária uma única administração (Kroschinsky et al., 2005).

Por fim, os rhG-CSF têm sido ainda utilizados em casos de neutropénia congénita cíclica, clínica e hematologicamente semelhante à que se verifica no *Collie* cinzento. Apesar de as oscilações nos valores absolutos de neutrófilos persistirem, os rhG-CSF são capazes de aumentar, de modo sustentado, as contagens destas células no sangue periférico, reduzindo o período de tempo de neutropénia, e de diminuir a incidência de febre e infecções secundárias (Hammond, Price, Souza & Dale, 1989; Welte et al., 1996).

Nos variados estudos, os rhG-CSF são fármacos que têm apresentado um bom perfil de segurança, representando a dor óssea e dor musculoesquelética os únicos efeitos adversos relativamente frequentes e significantes do ponto de vista clínico (Pentengell et al., 1992; Zinzani et al., 1994; Welte et al., 1996; Smith et al., 2015). Mais raramente, também foram registadas reações locais (nomeadamente dor, edema e eritema) no ponto de administração (Welte et al., 1996).

3.1.2. Utilização em medicina veterinária

Tendo em conta os efeitos benéficos que os rhG-CSF exibiram em várias doenças mielossupressoras na espécie humana, a sua implementação em tratamentos de suporte para afeções semelhantes foi considerada nos animais de companhia (Abrams-Ogg, 2000) de modo extra-indicação (*off-label*). Assim sendo, em medicina veterinária, os rhG-CSF podem ser potencialmente utilizados no maneio de processos oncológicos, infecciosos e imunomediados acompanhados de neutropénia, quando se suspeita que a produção do G-

CSF endógeno é inadequada. Tendo em conta a sua capacidade para induzir anticorpos neutralizantes, o seu custo relativamente dispendioso e escassez de evidência científica, o seu uso em medicina veterinária é ainda controverso (Plumb, 2015).

Dos rhG-CSF referidos, apenas o filgrastim e lenograstim já foram utilizados em medicina veterinária, sendo a posologia recomendada para o filgrastim 1,0 - 5,0 µg/kg/dia por via SC durante 3-5 dias (Ramsey, 2014; Plumb, 2015) e para o lenograstim 19,2 milhões de UI/m² por via IV lenta (30 minutos) ou SC SID durante 3-5 dias (Ramsey, 2014). O facto de se realizarem terapêuticas de curta duração não parece induzir a formação de anticorpos, encontrando-se a sua administração contraindicada durante um período superior a três semanas (Greene & Calpin, 2012).

A aplicação de rhG-CSF, em medicina veterinária, teve os seus primórdios no maneio da neutropénia cíclica do *Collie* cinzento, usado como modelo animal, com o objetivo de compreender a sua eficácia nesta doença e extrapolar a sua utilização para a espécie humana. Os vários estudos realizados neste âmbito apresentam resultados concordantes, na medida em que a administração contínua de filgrastim a cães com neutropénia cíclica foi associada a uma neutrofilia persistente que se iniciou nas primeiras 12-24 horas da sua instituição, sendo também responsável por prevenir a ocorrência de ciclos expetáveis de neutropénia. Contudo, após 20-25 dias de tratamento registou-se um declínio na contagem dos neutrófilos sanguíneos com recorrência dos ciclos de neutropénia (Lothrop, Warren, Souza, Jones & Moore, 1988; Hammond, Boone, Donahue, Souza & Dale, 1990; Pratt et al., 1990).

Na área da oncologia, à semelhança do que se verifica em medicina humana, os rhG-CSF também se revestem de grande importância na prevenção e tratamento de episódios de neutropénia induzida por protocolos quimioterápicos citotóxicos, sendo apenas necessária uma terapêutica de curta duração (Kraft e Kuffer, 1995; Brown & Rogers, 2001a; Ramsey, 2014). Assim sendo, os rhG-CSF encontram-se particularmente indicados em casos de neutropénia moderada (com contagem de neutrófilos inferior a $1,00 \times 10^3/\mu\text{l}$) acompanhada de febre, neutropénia grave (com contagem de neutrófilos inferior a $0,50 \times 10^3/\mu\text{l}$) que persiste por mais de 72 horas e em animais com história de neutropénia febril em ciclos anteriores (Brown & Rogers, 2001a). A sua utilização de forma rotineira e profilática encontra-se contraindicada (Frimberger e Moore, 2009).

No que concerne a reações adversas medicamentosas idiossincráticas, um estudo refere o uso de rhG-CSF num caso clínico de pancitopénia causada pela administração crónica de captopril num cão, o que permitiu uma recuperação hematológica mais rápida (Holland et al., 1996). Já na publicação de Jung et al. (2015), o recurso a rhG-CSF durante três dias não foi capaz de reverter a neutropénia causada pela administração de fenobarbital.

A administração de rhG-CSF já foi também sugerida no tratamento da neutropénia secundária à parvovirose canina. No estudo de Kraft e Kuffer (1995) foi observado um aumento

significativo na contagem dos leucócitos totais no grupo tratado com filgrastim quando comparado com o controlo. No entanto, estudos mais recentes não têm comprovado esta eficácia. Rewerts, McCaw, Cohn, Wagner-Mann e Harrington (1998) não encontraram diferenças significativas no que respeita a duração de hospitalização, contagens absolutas de neutrófilos e período de tempo até que a contagem de neutrófilos fosse superior a $1,5 \times 10^3/\mu\text{l}$ entre cachorros com parvovirose tratados com um rhG-CSF e não tratados com este fármaco. Resultados idênticos foram obtidos nos trabalhos de Mischke, Barth, Wohlsein, Rohn e Nolte (2001), nos quais a taxa de sobrevivência, as contagens de leucócitos totais e de neutrófilos, assim como outros parâmetros hematológicos, não diferiram significativamente entre o grupo de cachorros aos quais foi administrado filgrastim e o grupo controlo não tratado com filgrastim. De acordo com Cohn et al. (1999), o G-CSF endógeno já se encontra aumentado em cães com neutropénia por parvovirose.

O filgrastim também já foi utilizado em gatinhos com neutropénia grave causada pelo PVF, mas no estudo de Kraft e Kuffer (1995) nenhuma alteração significativa foi encontrada nas contagens de leucócitos totais no sangue periférico dos animais tratados. Porém, uma publicação mais recente (Félix, Vilela & Niza, 2005) descreveu a utilização de filgrastim na panleucopénia felina (durante 5 dias) através da comparação de hemogramas realizados antes do tratamento, 24 horas após a primeira administração, no último dia do tratamento e passados 5 dias, tendo-se verificado que às 24 horas as contagens de neutrófilos já se encontravam dentro dos limiares de referência (quando antes se encontravam baixas) e no final do protocolo todos os indivíduos apresentavam neutrofilia. Após 5 dias, os valores já se encontravam novamente no intervalo de referência, exceto num indivíduo que ainda exibia neutrofilia. Durante a realização do estudo um dos gatos sucumbiu à doença, sendo que este iniciou o rhG-CSF 4 dias após o aparecimento dos sinais clínicos, ao passo que os restantes 6 gatos iniciaram passados 2 dias. Isto sugere que possa existir um período ideal, durante a fase inicial da doença, em que a administração de rhG-CSF é mais eficaz devido à presença de um maior número de células precursoras na medula óssea que ainda não foram afetadas pelo PVF. Porém, não pode ser de todo excluída a hipótese de ter sido o próprio filgrastim a ter contribuído para a progressão da doença e mortalidade neste animal. Apesar disto, o filgrastim foi bem tolerado nos outros gatos, não se registando qualquer efeito adverso (Félix et al., 2005).

Nas várias publicações que advogam a utilização de rhG-CSF, também tem sido referido que estes podem apresentar vantagens quando administrados a gatos infetados com FIV e/ou FeLV, contudo existem poucos estudos que suportem esta afirmação (Greene & Calpin, 2012; Ramsey, 2014). Tendo em conta os efeitos benéficos a nível hematológico e clínico em humanos infetados com VIH, Phillips et al. (2005) ensaiaram a utilização de filgrastim em gatos com FIV. Uma das partes deste estudo consistiu em avaliar o efeito *in vitro* deste fármaco na proliferação de células mononucleares no sangue periférico e em células da

medula óssea, assim como determinar a sua influência sobre a replicação viral. A segunda parte consistiu num estudo cruzado *in vivo*, cujo objetivo pretendia avaliar as alterações clínicas, hematológicas, no rácio M:E (determinado por aspirações medulares) e na carga viral que a terapêutica poderia causar, verificando concomitantemente a presença de anticorpos neutralizantes contra o filgrastim. Os resultados mostraram que o uso desta terapêutica foi responsável por uma proliferação *in vitro* dose-dependente nas células da medula óssea, não afetando as células mononucleares sanguíneas, e não exerceu qualquer efeito direto na replicação do FIV. Para além disto, os autores verificaram que o filgrastim não afetou a carga viral dos gatos infetados, nem a progressão clínica da doença, tendo aumentado de forma significativa a contagem dos neutrófilos periféricos com aumento no rácio M:E medular. Porém, a partir do dia 21 o número de neutrófilos decaiu, o que é explicado pela deteção concomitante de anticorpos neutralizantes. Deste modo, é possível concluir que os G-CSF recombinantes apresentam um potencial terapêutico interessante em gatos com neutropénia secundária a infeção com FIV; no entanto, à semelhança de indivíduos com VIH, pode ser necessária a administração de forma prolongada e recorrente, o que limita a utilização dos fármacos com origem humana.

Relativamente à infeção por *E. canis*, existe um estudo que descreve o tratamento de um cão com erliquiose crónica associada a pancitopénia grave, refratária à terapêutica convencional, recorrendo a corticoterapia prolongada e fatores hematopoiéticos recombinantes humanos (nomeadamente, rhG-CSF e eritropoietina). Apesar do sucesso terapêutico, a utilização de rhG-CSF não provocou um aumento na contagem de neutrófilos ao longo do período em que foi administrado, questionando-se a sua eficácia nesta afeção. Contudo, os autores colocam a hipótese de ter sido responsável por um aumento da função dos neutrófilos remanescentes (Aroch & Harrus, 2001).

A utilização de filgrastim também já foi tentada no maneio de casos de hiperestrogenismo acompanhados de neutropénia grave, estando associada a um aumento significativo na contagem dos leucócitos totais (Kraft & Kuffer, 1995). Uma abordagem diferente foi considerada na publicação de Suttorp, Hoffmann e Sippell (2002), na qual se procedeu à administração precoce de filgrastim, a título preventivo, a uma cadela após intoxicação aguda por ingestão de uma dose potencialmente letal de estrogénios, de modo a evitar os seus efeitos mielossupressores e o desenvolvimento de pancitopénia. Após quatro dias de terapêutica, uma aspiração medular revelou hiper celularidade com aumento das células precursoras de granulócitos e uma ligeira diminuição na eritropoiese e trombocitopoiese. Os hemogramas seriados realizados mostraram uma leucocitose persistente, não se chegando a desenvolver pancitopénia durante as primeiras 8 semanas após a ingestão de estrogénios.

3.2. Fator estimulador de colónias de granulócitos recombinante canino

Um G-CSF recombinante canino (rcG-CSF) também já foi produzido, mas não se encontra comercialmente disponível. No entanto, têm sido realizados estudos científicos com esta molécula de modo a compreender a sua utilidade nos animais de companhia (Abrams-Ogg, 2000). Nesta medida, foi realizado por Obradovich, Ogilvie, Powers e Boone (1991) um estudo que pretendeu avaliar os efeitos hematológicos do rcG-CSF em cinco cães saudáveis aos quais foram administrados 5,0 µg/kg SID por via SC durante 28 dias. Os resultados obtidos mostraram que a contagem absoluta dos leucócitos totais aumentou de forma significativa nas primeiras 24 horas devido ao aumento dos neutrófilos e monócitos. Após este aumento inicial, registou-se um *plateau* durante 5 dias e, ao sétimo dia, os leucócitos no sangue periférico voltaram a aumentar significativamente, tendo este aumento persistido até ao final dos 28 dias. Após descontinuação do rcG-CSF, os valores hematológicos retornaram ao limite basal passados 5 dias. A três destes cães foram realizadas aspirações medulares, tendo-se verificado hiperplasia da medula óssea com aumento do rácio M:E. Apesar de não se terem registado efeitos adversos, nalguns casos foram notadas manifestações de irritação local no ponto de injeção. Num estudo semelhante efetuado por Obradovich et al. (1993), cinco gatos saudáveis foram sujeitos à administração de rcG-CSF segundo a posologia de 5,0 µg/kg SID por via SC durante 42 dias com o objetivo de avaliar o seu efeito na contagem de neutrófilos no sangue periférico. Os resultados mostraram que não houve evidência clínica e hematológica de formação de anticorpos contra o rcG-CSF, sugerindo-se que a molécula canina é mais homóloga à felina do que a humana. Como tal, nos gatos deste estudo verificou-se a indução e manutenção de neutrofilia durante os 42 dias, seguindo-se um padrão semelhante ao descrito em cães (aumento significativo nas primeiras 24 horas, *plateau* entre os dias 2-5 e novo aumento significativo no dia 6). Após descontinuação, as contagens de neutrófilos regressaram aos valores pré-administração em 5 dias. Tal como nos cães, não se registaram efeitos adversos. Deste modo, ambos os trabalhos demonstram que o rcG-CSF apresenta vantagens terapêuticas em relação ao rhG-CSF, principalmente quando necessário a longo prazo, tendo em conta os resultados promissores e a sua aparente segurança.

Com o objetivo de avaliar a sua eficácia no manejo de neutropénia induzida por agentes quimioterápicos citotóxicos, Ogilvie e seus colaboradores (1992) compararam os valores hematológicos de cães aos quais foi administrado rcG-CSF com o grupo controlo após ter sido induzida neutropénia com mitoxantrona. Este estudo demonstrou que o rcG-CSF reduziu a gravidade e a duração da neutropénia, o que potencialmente traz benefícios a nível da redução da morbilidade e mortalidade a ela associadas e permite o uso de doses superiores de quimioterápicos. De modo semelhante, Yamamoto, Fujino, Tsuchiya e Iwata (2011) recorreram a ciclofosfamida para induzir neutropénia em cães e avaliaram o efeito do rcG-CSF através da comparação com um grupo controlo, assim como a eficácia quando usado de forma profilática ou terapêutica. Os resultados são coincidentes com os relatados

previamente, verificando-se que o uso de rcG-CSF diminuiu a duração da neutropénia. Os cães tratados profilaticamente (antes da neutropénia ocorrer) recuperaram mais rapidamente. A utilização de rcG-CSF também já foi estudada em cães com parvovirose, tendo-se verificado que as contagens de leucócitos totais e de neutrófilos foram significativamente mais altas nos cães tratados com este fármaco, e com menor tempo de hospitalização associado, quando comparado com o grupo controlo submetido a um abordagem terapêutica semelhante, mas sem rcG-CSF. Contudo, estes resultados não se repercutiram numa melhor eficácia clínica, tendo em conta que a taxa de sobrevivência foi inferior no grupo de cães aos quais foi administrado rcG-CSF (Duffy, Dow, Ogilvie, Rao, & Hackett, 2010).

3.3. Fator estimulador de colónias de granulócitos recombinante felino

Um G-CSF recombinante felino (rfG-CSF) também já foi desenvolvido e a sua utilização ensaiada *in vivo* em gatos saudáveis (Yamamoto et al., 2002). De acordo com este estudo, o rfG-CSF foi responsável por um aumento rápido e significativo do número absoluto de neutrófilos no sangue, retornando aos valores basais imediatamente após a sua descontinuação. Esta observação ocorreu novamente num segundo e terceiro ciclos de tratamento, o que demonstra que os gatos são capazes de responder eficazmente a doses repetidas. Para além disto, os autores ainda concluíram que o rfG-CSF utilizado não induziu a formação de anticorpos neutralizantes.

Dado o curto tempo de semi-vida do rfG-CSF, Coleman et al. (2014) produziram uma versão equivalente com uma molécula de polietilenoglicol adicionada com o objetivo de prolongar a sua ação, a que atribuíram a designação de PegrfG-CSF. Os seus trabalhos mostraram que o PegrfG-CSF administrado semanalmente durante 4 semanas foi responsável por um aumento significativo no número de neutrófilos em gatos saudáveis e com infeção por FIV, sem induzir a formação de anticorpos neutralizantes. Estes resultados são comparáveis com a forma recombinante felina não peguilada, diferindo o PegrfG-CSF desta apenas na capacidade de manter os níveis de neutrófilos elevados de modo mais sustentado. Foi também objetivo deste estudo verificar se o PegrfG-CSF seria capaz de reverter a neutropénia causada pela administração crónica de rhG-CSF, o que revelou resultados positivos.

No entanto, nenhum dos fatores recombinantes felinos referidos anteriormente se encontra comercialmente disponível, estando o seu uso exclusivamente restrito a projetos de investigação.

1. Introdução

Face aos estudos atualmente existentes acerca da utilização dos rhG-CSF em medicina humana, são notórios os efeitos benéficos que estes fármacos exercem em várias afeções no homem, representando um avanço científico notável nas áreas de hematologia e oncologia. Já em medicina veterinária, o seu uso não tem reunido consenso, tendo em conta que a literatura é ainda escassa, por vezes controversa e que a administração de rhG-CSF não é isenta de complicações quando instituída de modo prolongado. Ainda assim, é interessante investigar a potencialidade da sua aplicação em terapêuticas de curta duração nos animais de companhia, nos quais a neutropénia é uma manifestação hematológica de várias doenças, algumas das quais relativamente comuns na prática clínica em Portugal. Desta forma, e tendo em conta a grande casuística de casos clínicos em que se recorre à administração de rhG-CSF no Hospital Veterinário das Laranjeiras, foi considerado pertinente fazer a análise da sua utilização, de modo a avaliar a eficácia clínica destes fármacos e contribuir para o estudo da sua administração em canídeos e felídeos.

2. Objetivo

O presente estudo tem como objetivo primário caracterizar retrospectivamente a utilização de rhG-CSF em relação à amostra populacional à qual foi administrado e à etiologia subjacente, assim como avaliar o seu efeito em vários parâmetros hematológicos. Para além disto, pretende-se também verificar se o facto de haver resposta ao rhG-CSF é influenciado pela etiologia e pelo grau de neutropénia inicial e se se encontra associado a uma maior sobrevivência dos animais.

3. Materiais e métodos

3.1. Amostra e critérios de inclusão

Os casos clínicos apresentados neste estudo foram recolhidos no HVL no período compreendido entre Outubro de 2011 e Junho de 2016, tendo sido incluídos todos os canídeos e felídeos com neutropénia, aos quais foi administrado um rhG-CSF e com um hemograma realizado antes da sua administração e um hemograma de seguimento 48 horas depois do início do protocolo.

3.2. Recolha dos dados

Através de uma pesquisa na base de dados do HVL construída com o *software* de gestão veterinário QVET[®] foram identificados todos os tutores que adquiriram filgrastim e lenograstim e, posteriormente, analisadas todas as fichas clínicas dos respetivos animais. Dos que exigiram hospitalização, também foram consultadas as fichas de internamento desse período.

3.3. Parâmetros analisados e tratamento dos dados

A partir das fichas clínicas foram recolhidas as seguintes informações, relativamente a cada caso clínico: espécie, raça, idade, sexo e condição fértil do animal (com o objetivo de caracterizar a amostra em estudo), etiologia da neutropénia, rhG-CSF utilizado, resultados do hemograma inicial (T0) e do hemograma efetuado 48 horas após a primeira administração (T1) relativamente aos parâmetros leucócitos totais, neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos, basófilos, eritrócitos e plaquetas, tendo sido ainda registado o desfecho clínico, categorizando-o em alta médica ou óbito.

Considerou-se que estava presente neutropénia quando a contagem de neutrófilos absolutos no sangue periférico no momento T0 era inferior a $3,00 \times 10^3/\mu\text{l}$ nos canídeos e inferior a $2,50 \times 10^3/\mu\text{l}$ nos felídeos. Seguidamente, a neutropénia inicial foi organizada em três classes de gravidade, cujos intervalos foram definidos neste estudo com base numa divisão equitativa dos valores. Assim, de acordo com o número absoluto de neutrófilos em T0, a neutropénia inicial foi classificada em ligeira (cães: $2,00 - 2,99 \times 10^3/\mu\text{l}$; gatos: $1,66 - 2,49 \times 10^3/\mu\text{l}$), moderada (cães: $1,00 - 1,99 \times 10^3/\mu\text{l}$; gatos: $0,83 - 1,65 \times 10^3/\mu\text{l}$) ou grave (cães: $< 1,00 \times 10^3/\mu\text{l}$; gatos: $< 0,83 \times 10^3/\mu\text{l}$).

De modo a calcular a taxa de resposta aos rhG-CSF foi considerado que esta é positiva quando o valor dos neutrófilos no hemograma realizado 48 horas após o início da administração atinge, pelo menos, o valor mínimo de referência com concomitante aumento percentual igual ou superior a 100%.

3.4. Medicamentos

Relativamente aos rhG-CSF utilizados neste estudo, recorreu-se a especialidades farmacêuticas com a substância ativa filgrastim (Tevagrastim[®], Teva) e lenograstim (Granocyte[®], Sanofi) na posologia recomendada (filgrastim: $1,0-5,0 \mu\text{g}/\text{kg}$ SC, SID; lenograstim: $19,2$ milhões UI/m² IV lento ou SC, SID; máximo de 5 dias)

3.5. Equipamento

Para a realização dos hemogramas foi utilizado o analisador automático VetScan HM5 da Abaxis[®], podendo os intervalos de referência para os diversos parâmetros hematológicos avaliados ser consultados no Anexo 1.

3.6. Análise estatística

Os dados recolhidos foram inseridos no Excel 2013 da Microsoft[®] Office e importados para o software IBM-SPSS[®] versão 22.0 para a sua análise.

Para a caracterização das variáveis categóricas foi realizada estatística descritiva.

De modo a verificar a significância das alterações registadas no hemograma inicial e no de seguimento foi utilizado o *Wilcoxon Signed-Rank Test* (um teste não paramétrico usado para comparar amostras pareadas), sendo a hipótese nula (H_0): a mediana de cada parâmetro

hematológico antes do tratamento com rhG-CSF e 48 horas depois do início do mesmo não é diferente.

Para averiguar a existência de associação entre as variáveis qualitativas em estudo (taxa de resposta, etiologia da neutropénia, grau de neutropénia inicial e desfecho clínico) recorreu-se ao teste exato de Fisher.

Em todas as análises de dados efetuadas, os resultados foram considerados estatisticamente significativos para valores de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Caracterização da amostra

A amostra deste estudo é composta por 30 animais, dos quais 14 são canídeos (46,7%) e 16 felídeos (53,3%).

4.1.1. Canídeos

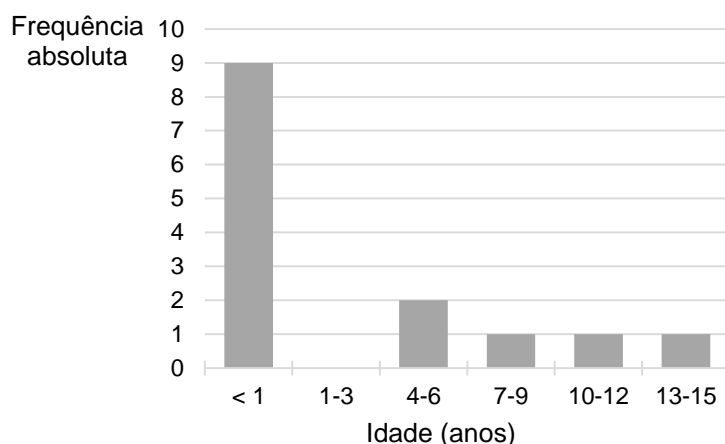
Para a caracterização rática dos canídeos, foram usadas como referência as raças reconhecidas pela FCI (*Fédération Cynologique Internationale*), cujo representante em Portugal é o CPC (Clube Português de Canicultura). Assim, na amostra de 14 cães, 3 não apresentavam raça definida, distribuindo-se os restantes 11 por oito raças (tabela 4).

Tabela 4: Distribuição das frequências absoluta e relativa das raças dos canídeos da amostra.

Raça	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Sem raça definida	3	21,5
Retriever do Labrador	3	21,5
<i>Yorkshire Terrier</i>	2	14,4
<i>Beagle</i>	1	7,1
<i>Border Collie</i>	1	7,1
<i>Chihuahua</i>	1	7,1
<i>Jack Russell Terrier</i>	1	7,1
<i>Pug</i>	1	7,1
<i>West Highland White Terrier</i>	1	7,1
Total	14	100,0

A distribuição por classes da idade dos canídeos da amostra pode ser consultada no gráfico 1. A idade mínima registada foi de 0,13 anos (equivalente a 1,5 meses) e a máxima de 14 anos, obtendo-se a média de 3,19 anos com desvio padrão de 4,65 e mediana de 0,46 anos (equivalente a 5,5 meses).

Gráfico 1: Distribuição da idade dos canídeos da amostra.



Em relação ao sexo e estatuto reprodutivo, contabilizam-se 7 machos férteis (50,0%), 2 fêmeas férteis (14,3%), 2 machos orquiectomizados (14,3%) e 3 fêmeas ovariectomizadas (21,4%), como se observa na tabela 5.

Tabela 5: Distribuição das frequências absoluta e relativa do sexo e estatuto reprodutivo dos canídeos da amostra.

		Estatuto Reprodutivo			
		Fértil	Castrado	Total	
Sexo	Macho	Frequência absoluta	7	2	9
		Frequência relativa (%)	50,0	14,3	64,3
	Fêmea	Frequência absoluta	2	3	5
		Frequência relativa (%)	14,3	21,4	35,7
Total		Frequência absoluta	9	5	14
		Frequência relativa (%)	64,3	35,7	100,0

4.1.2. Felídeos

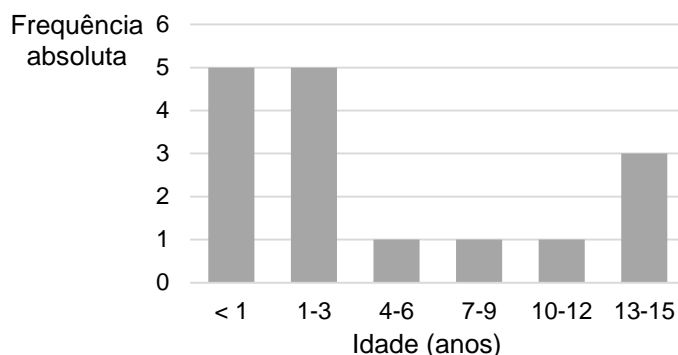
De acordo com as denominações adotadas pelo CPF (Clube Português de Felinicultura) e a FIFe (*Fédération Internationale Féline*), na amostra de 16 felídeos, a grande maioria não apresenta raça definida, apesar de também estarem representadas duas raças (tabela 6).

Tabela 6: Distribuição das frequências absoluta e relativa das raças dos felídeos da amostra.

Raça	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Sem raça definida	14	87,4
Persa	1	6,3
Siamês	1	6,3
Total	16	100,0

No gráfico 2 pode observar-se a distribuição dos felídeos por classes etárias. A idade nestes animais variou desde os 0,17 anos (equivalente a 2 meses) aos 15 anos, sendo a média 4,70 anos, desvio padrão de 5,50 e mediana de 2,00 anos.

Gráfico 2: Distribuição da idade dos felídeos da amostra.



Caracterizando o sexo e estatuto reprodutivo, contabilizam-se 4 machos férteis (25,0%), 6 fêmeas férteis (37,5%), 4 machos orquiectomizados (25,0%) e 2 fêmeas ovariectomizadas (12,5%) (tabela 7).

Tabela 7: Distribuição das frequências absoluta e relativa do sexo e estatuto reprodutivo dos felídeos da amostra.

		Estatuto Reprodutivo			
		Fértil	Castrado	Total	
Sexo	Macho	Frequência absoluta	4	4	8
		Frequência relativa (%)	25,0	25,0	50,0
	Fêmea	Frequência absoluta	6	2	8
		Frequência relativa (%)	37,5	12,5	50,0
Total		Frequência absoluta	10	6	16
		Frequência relativa (%)	62,5	37,5	100,0

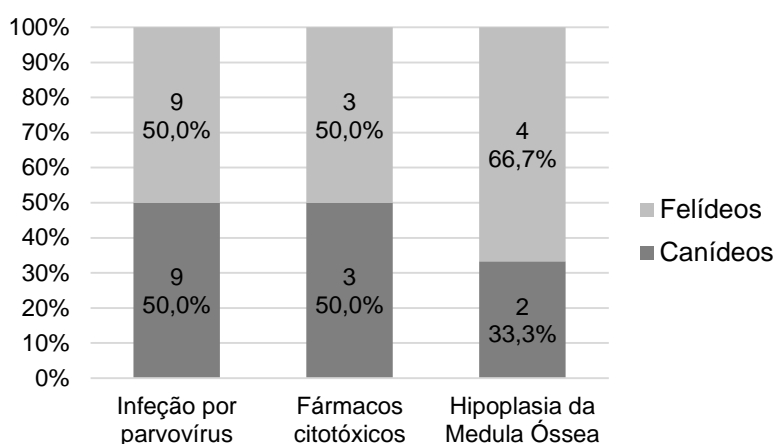
4.2. Caracterização da etiologia da neutropénia

Na amostra em estudo as causas subjacentes à utilização de rhG-CSF foram reunidas em três grupos, nomeadamente infeção por parvovírus, mielotoxicidade induzida pela administração de fármacos citotóxicos e hipoplasia da medula óssea (tabela 8), estando apresentado no gráfico 3 a sua distribuição por espécie.

Tabela 8: Distribuição das frequências absoluta e relativa da etiologia da neutropénia da amostra.

Etiologia	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Infeção por parvovírus	18	60,0
Fármacos citotóxicos	6	20,0
Hipoplasia da medula óssea	6	20,0
Total	30	100,0%

Gráfico 3: Distribuição das frequências absoluta e relativa da etiologia da neutropénia por espécie.



Assim, é possível verificar que, no âmbito da infecção por parvovírus, 9 (50,0%) dos casos englobados são referentes à parvovirose canina, enquanto os restantes 9 (50,0%) correspondem à panleucopénia felina.

Relativamente à neutropénia causada por fármacos citotóxicos, os casos incluídos neste estudo são secundários à utilização do protocolo quimioterápico CHOP (que se caracteriza pela combinação de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisolona) em dois felídeos e num canídeo (50,0%), mas também à administração única de vincristina num canídeo (16,7%), de toceranib num outro canídeo (16,7%) e de ciclofosfamida num felídeo (16,7%). Na tabela 9 apresentam-se as afeções subjacentes ao recurso a estes fármacos.

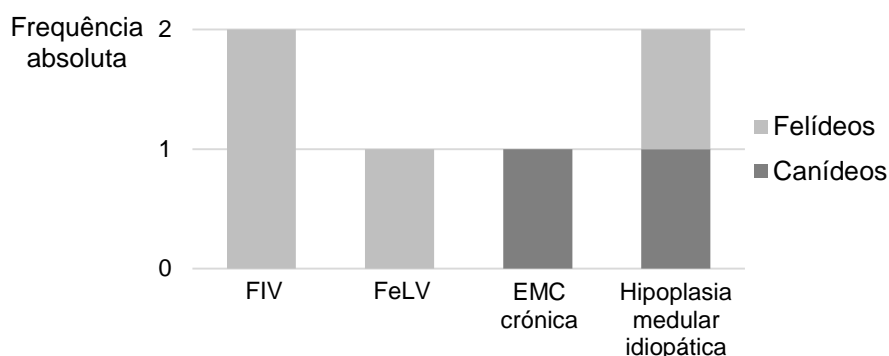
Tabela 9: Afeções subjacentes à utilização de fármacos citotóxicos da amostra.

Fármaco	Espécie	Etiologia	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Protocolo CHOP	Felina	Linfoma intestinal	2	33,3
	Canina	Linfoma multicêntrico	1	16,7
Vincristina	Canina	TIM idiopática refratária	1	16,7
Toceranib	Canina	Mastocitoma	1	16,7
Ciclofosfamida	Felina	AHIM idiopática refratária	1	16,7
Total			6	100,0

Legenda: TIM = Trombocitopénia Imunomediada; AHIM = Anemia Hemolítica Imunomediada.

Os casos clínicos de hipoplasia medular (gráfico 4) são maioritariamente referentes a causas infecciosas, nomeadamente à infecção por FIV em dois felídeos (33,3%), por FeLV num outro felídeo (16,7%) e por *E. canis* em fase crónica num canídeo (16,7%). Neste grupo estão ainda incluídas duas situações de hipoplasia medular idiopática (33,3%) num felídeo e num canídeo, nos quais não se conseguiu atingir um diagnóstico definitivo.

Gráfico 4: Distribuição dos casos de hipoplasia medular da amostra.



4.3. Caracterização da neutropénia inicial

Antes de se proceder a administração do rhG-CSF, 6 animais exibiam neutropénia ligeira (20,0%), 10 neutropénia moderada (33,3%) e 14 neutropénia grave (46,7%), sendo que o valor médio, desvio padrão e mediana de cada categoria e as frequências absoluta e relativa, apresentados por espécie, podem ser observados na tabela 10.

Tabela 10: Caracterização do grau de neutropénia inicial nos canídeos e nos felídeos.

Grau de Neutropénia	Média (x 10 ³ /µl)	Desvio Padrão (x 10 ³ /µl)	Mediana (x 10 ³ /µl)	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Canídeos					
Ligeira	2,40	0,36	2,37	4	28,6
Moderada	1,39	0,23	1,28	5	35,7
Grave	0,55	0,24	0,52	5	35,7
Total				14	100,0
Felídeos					
Ligeira	2,18	0,28	2,18	2	12,5
Moderada	1,27	0,22	1,21	5	31,2
Grave	0,21	0,23	0,10	9	56,3
Total				16	100,0

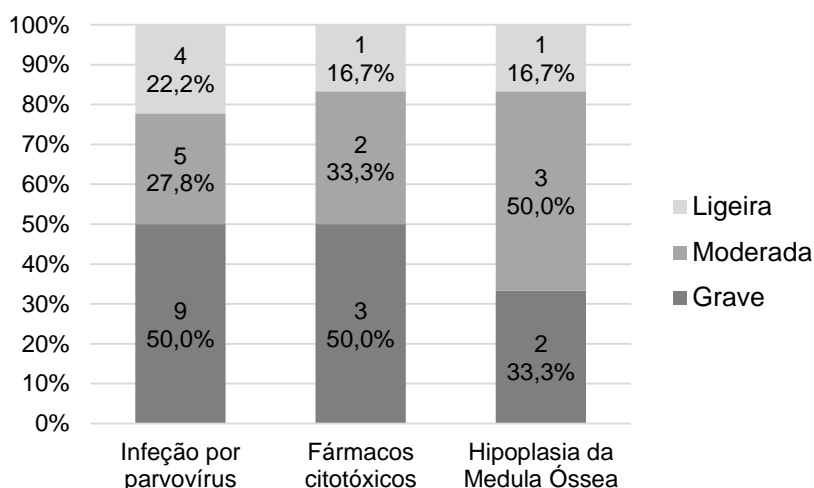
4.3.1. Caracterização da neutropénia inicial quanto à etiologia

Considerando a etiologia (gráfico 5), verifica-se que, aquando da apresentação, 50,0% (n=9) dos animais com infeção por parvovírus exibiam neutropénia grave, 27,8% (n=5) neutropénia moderada e 22,2% (n=4) neutropénia ligeira.

Relativamente aos animais aos quais foram administrados fármacos mielotóxicos, estes foram responsáveis por causar uma neutropénia grave em 50,0% (n=3) dos animais, neutropénia moderada em 33,3% (n=2) e neutropénia ligeira em 16,7% (n=1).

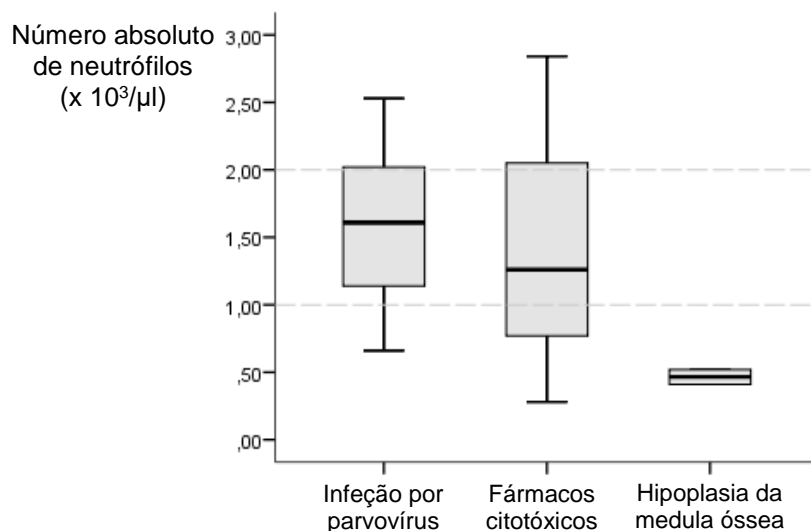
Por último, dos animais com hipoplasia da medula óssea, 33,3% (n=2) exibiam neutropénia inicial grave, 50,0% (n=3) neutropénia moderada e apenas 16,7% (n=1) neutropénia ligeira.

Gráfico 5: Distribuição das frequências absoluta e relativa dos graus de neutropénia por etiologia.



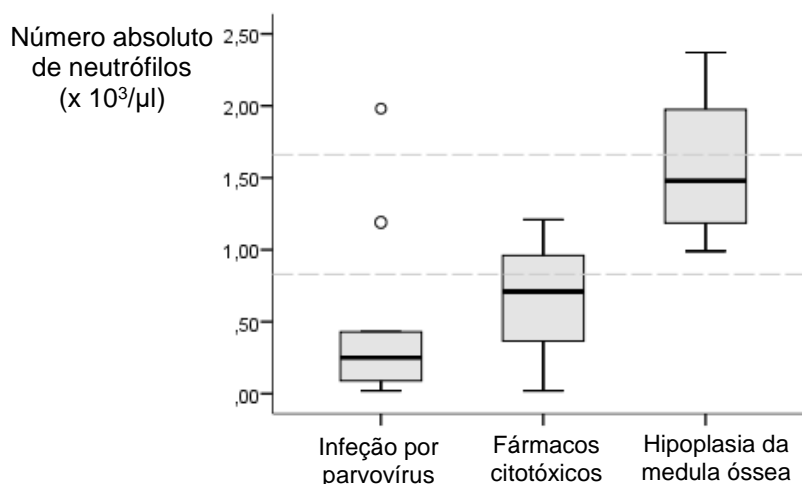
Em termos de valores absolutos dos neutrófilos iniciais, a sua distribuição por etiologia é apresentada nos gráficos 6 e 7, relativos aos canídeos e felídeos, respetivamente, tendo em conta que o intervalo de referência deste parâmetro hematológico difere nestas espécies.

Gráfico 6: Distribuição do número absoluto de neutrófilos iniciais por etiologia (canídeos).



Legenda: as barras centrais representam a mediana, as caixas incluem os valores entre o primeiro e o terceiro quartis e os bigodes representam os valores máximo e mínimo.

Gráfico 7: Distribuição do número absoluto de neutrófilos iniciais por etiologia (felídeos).



Legenda: as barras centrais representam a mediana, as caixas incluem os valores entre o primeiro e o terceiro quartis, os bigodes representam os valores máximo e mínimo (com exceção do bigode superior referente à infecção por parvovírus que representa a maior observação abaixo de 1,5 vezes o intervalo interquartil) e os círculos correspondem aos *outliers*.

4.4. Caracterização da utilização de rhG-CSF

Na amostra em estudo, o filgrastim foi administrado a 25 animais (83,3%), enquanto o lenograstim foi utilizado em 5 casos (16,7%) (tabela 11).

Tabela 11: Distribuição da frequência relativa do rhG-CSF utilizado por etiologia na totalidade da amostra.

		rhG-CSF		Total
		Filgrastim	Lenograstim	
Etiologia	Infeção por parvovírus	43,3%	16,7%	60,0%
	Fármacos citotóxicos	20,0%	0,0%	20,0%
	Hipoplasia da medula óssea	20,0%	0,0%	20,0%
Total		83,3%	16,7%	100,0%

4.4.1. Efeito nos parâmetros hematológicos

A caracterização de cada parâmetro avaliado no hemograma inicial e no de seguimento é realizada através da apresentação da média, desvio padrão e mediana na amostra de animais com infecção por parvovírus (tabela 12), neutropenia induzida pela utilização de fármacos citotóxicos (tabela 13) e hipoplasia da medula óssea (tabela 14). Nestas tabelas é ainda apresentado o resultado do valor p obtido pela aplicação do *Wilcoxon Signed-Rank Test* para comparação dos valores obtidos para cada parâmetro nos dois momentos temporais.

Tabela 12: Caracterização quantitativa dos parâmetros hematológicos registrados no hemograma inicial (T0) e de seguimento (T1) e resultado do *Wilcoxon Signed-Rank Test* na amostra de animais com infecção por parvovírus.

Parâmetro		Média	Desvio Padrão	Mediana	<i>Wilcoxon Signed-Rank Test</i>	
Leucócitos totais (x 10 ³ /µl)	T0	2,01	1,07	2,07	p = 0,0004	S
	T1	17,53	16,10	14,29		
Neutrófilos (x 10 ³ /µl)	T0	1,02	0,83	1,02	p = 0,0004	S
	T1	13,95	14,09	10,82		
Linfócitos (x 10 ³ /µl)	T0	0,86	0,43	0,74	p = 0,001	S
	T1	2,34	1,43	2,16		
Monócitos (x 10 ³ /µl)	T0	0,09	0,06	0,09	p = 0,001	S
	T1	1,09	1,39	0,61		
Eosinófilos (x 10 ³ /µl)	T0	0,04	0,04	0,02	p = 0,003	S
	T1	0,13	0,12	0,07		
Basófilos (x 10 ³ /µl)	T0	0,01	0,01	0,00	p = 0,389	NS
	T1	0,02	0,04	0,00		
Eritrócitos (x 10 ⁶ /µl)	T0	7,24	1,53	7,54	p = 0,0002	S
	T1	6,35	1,52	6,61		
Plaquetas (x 10 ³ /µl)	T0	254,5	199,3	204,5	p = 0,157	NS
	T1	226,7	211,6	146,0		

Legenda: S = diferença estatisticamente significativa; NS = diferença estatisticamente não significativa.

Tabela 13: Caracterização quantitativa dos parâmetros hematológicos registrados no hemograma inicial (T0) e de seguimento (T1) e resultado do *Wilcoxon Signed-Rank Test* na amostra de animais com mielossupressão induzida por fármacos citotóxicos.

Parâmetro		Média	Desvio Padrão	Mediana	<i>Wilcoxon Signed-Rank Test</i>	
Leucócitos totais (x 10 ³ /µl)	T0	2,42	2,12	1,73	p = 0,028	S
	T1	8,99	3,74	8,78		
Neutrófilos (x 10 ³ /µl)	T0	1,05	1,00	0,96	p = 0,027	S
	T1	6,85	3,25	5,89		
Linfócitos (x 10 ³ /µl)	T0	1,15	1,79	0,44	p = 0,600	NS
	T1	1,53	1,66	0,70		
Monócitos (x 10 ³ /µl)	T0	0,15	0,19	0,10	p = 0,075	NS
	T1	0,51	0,25	0,47		
Eosinófilos (x 10 ³ /µl)	T0	0,05	0,04	0,03	p = 0,892	NS
	T1	0,11	0,18	0,04		
Basófilos (x 10 ³ /µl)	T0	0,01	0,01	0,02	p = 0,180	NS
	T1	0,01	0,01	0,01		
Eritrócitos (x 10 ⁶ /µl)	T0	6,57	2,54	6,80	p = 0,028	S
	T1	5,26	2,18	5,00		
Plaquetas (x 10 ³ /µl)	T0	208,8	196,6	142,0	p = 0,249	NS
	T1	138,3	91,47	132,5		

Legenda: S = diferença estatisticamente significativa; NS = diferença estatisticamente não significativa

Tabela 14: Caracterização quantitativa dos parâmetros hematológicos registrados no hemograma inicial (T0) e de seguimento (T1) e resultado do *Wilcoxon Signed-Rank Test* na amostra de animais com hipoplasia da medula óssea.

Parâmetro		Média	Desvio Padrão	Mediana	<i>Wilcoxon Signed-Rank Test</i>	
Leucócitos totais (x 10 ³ /μl)	T0	2,20	1,29	2,04	p = 0,028	S
	T1	7,71	9,52	3,44		
Neutrófilos (x 10 ³ /μl)	T0	1,21	0,73	1,19	p = 0,028	S
	T1	5,43	6,51	2,61		
Linfócitos (x 10 ³ /μl)	T0	0,84	0,89	0,72	p = 0,075	NS
	T1	1,76	2,49	0,84		
Monócitos (x 10 ³ /μl)	T0	0,10	0,05	0,09	p = 0,104	NS
	T1	0,24	0,25	0,12		
Eosinófilos (x 10 ³ /μl)	T0	0,06	0,07	0,04	p = 0,345	NS
	T1	0,13	0,17	0,07		
Basófilos (x 10 ³ /μl)	T0	0,00	0,00	0,00	p = 1,000	NS
	T1	0,00	0,00	0,00		
Eritrócitos (x 10 ⁶ /μl)	T0	5,94	3,06	5,61	p = 0,600	NS
	T1	5,83	1,51	5,64		
Plaquetas (x 10 ³ /μl)	T0	42,50	35,36	41,00	p = 0,917	NS
	T1	45,67	37,95	51,00		

Legenda: S = diferença estatisticamente significativa; NS = diferença estatisticamente não significativa

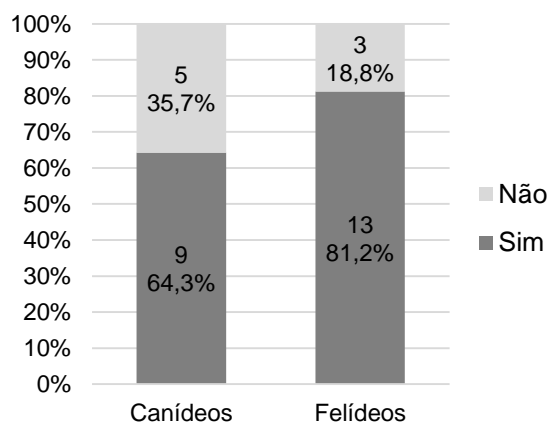
4.4.2. Taxa de resposta

Tendo em conta o critério considerado neste estudo, é possível afirmar que, dos 30 animais, 22 responderam positivamente à administração do rhG-CSF (73,3%) (tabela 15), estando apresentado no gráfico 8 a sua distribuição por espécie.

Tabela 15: Taxa de resposta aos rhG-CSF.

Resposta	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Sim	22	73,3
Não	8	26,7
Total	30	100,0%

Gráfico 8: Taxa de resposta aos rhG-CSF por espécie.



Com o objetivo de verificar se a taxa de resposta era influenciada pela espécie foi realizado o teste exato de Fisher, obtendo-se o valor de $p = 0,417$ (diferença estatisticamente não significativa).

4.4.2.1. Associação com a etiologia

Sendo um dos objetivos deste estudo verificar se a taxa de resposta se relacionava com a etiologia da neutropénia, foi feito o cruzamento dos dados relativos à etiologia e à taxa de resposta (tabela 16) e aplicado o teste exato de Fisher, tendo-se obtido o valor $p = 0,041$ (diferença estatisticamente significativa).

Tabela 16: Tabela cruzada entre o grupo etiológico e a taxa de resposta.

		Resposta		Total
		Sim	Não	
Etiologia	Infeção por parvovírus	14	4	18
	Fármacos citotóxicos	6	0	6
	Hipoplasia da medula óssea	2	4	6
Total		22	8	30

Como é possível observar nesta tabela, 14 (77,8%) dos animais englobados na amostra com infeção por parvovírus responderam à administração de rhG-CSF. Uma resposta mais favorável foi obtida pela amostra de animais com neutropénia induzida por fármacos citotóxicos, uma vez que todos os 6 representantes (100,0%) responderam positivamente. Relativamente ao grupo de animais com hipoplasia medular, apenas 2 indivíduos (33,3%) responderam aos rhG-CSF, nomeadamente um dos gatos com FIV e o gato com FeLV.

4.4.2.2. Associação com o grau de neutropénia inicial

Para além disto, também se pretendeu verificar se o facto de haver resposta dependia do grau de neutropénia inicial e, para tal, foi construída uma tabela cruzada com estas variáveis (tabela 17) e realizado o teste exato de Fisher, no qual se obteve o valor $p = 0,081$ (diferença estatisticamente não significativa).

Tabela 17: Tabela cruzada entre o grau de neutropénia e a taxa de resposta.

		Resposta		Total
		Sim	Não	
Neutropénia	Ligeira	2	4	6
	Moderada	8	2	10
	Grave	12	2	14
Total		22	8	30

Ainda assim, o cruzamento destes dados mostra que a taxa de resposta nos animais com neutropénia de grau ligeiro foi apenas de 33,3% ($n=2/6$), notando-se uma maior proporção de resposta nos animais com neutropénia inicial moderada, na qual a taxa foi de 80,0% ($n=8/10$), e nos casos associados a neutropénia grave, como uma taxa de resposta de 85,7% ($n=12/14$).

4.4.2.3. Associação com o desfecho clínico

Por fim, também era objetivo deste estudo avaliar se a taxa de resposta influenciava o desfecho clínico, nomeadamente em termos de sobrevivência, sendo os animais classificados como tendo alta clínica ou sofrido óbito (de forma natural ou eutanásia). Deste modo, pode ser consultada na tabela 18 o cruzamento destes dados. O teste exato de Fisher foi também realizado, tendo-se obtido o valor $p = 0,001$ (diferença estatisticamente significativa).

Tabela 18: Tabela cruzada entre o desfecho clínico e a taxa de resposta.

		Desfecho clínico		Total
		Alta	Óbito	
Resposta	Sim	20	2	22
	Não	2	6	8
Total		22	8	30

Deste modo, é possível verificar que, dos 22 animais que responderam à terapêutica com rhG-CSF, 20 (90,9%) tiveram alta médica. Dos animais que não responderam, apenas 2 (25,0%) tiveram alta médica.

5. Discussão

A neutropénia é uma manifestação hematológica que se encontra associada a variadas afeções, mas que, independentemente da etiologia, contribui de modo significativo para a morbidade e mortalidade dos doentes. A presença de um baixo número de neutrófilos em circulação é responsável pelo estabelecimento de um estado de imunossupressão que não só diminui a competência do sistema imunitário para responder à invasão de microrganismos patogénicos, como também aumenta a suscetibilidade à microbiota comensal, podendo ocorrer infeções secundárias oportunistas particularmente graves. Dado o potencial descrito dos rhG-CSF para reverter situações de neutropénia e, deste modo, prevenir as complicações que dela decorrem, esta dissertação teve como objetivo avaliar de forma retrospectiva a utilização destes fármacos em várias doenças em canídeos e felídeos, tendo sido alvo de estudo o filgrastim e o lenograstim. Com base em 16 estudos clínicos que comparam a utilização de ambos em indivíduos saudáveis e com afeções para os quais se encontram indicados, foi demonstrado que o filgrastim e o lenograstim apresentam uma eficácia clínica equiparável, não se registando superioridade de um relativamente ao outro (Sourgens & Lefrère, 2011). Como tal, optou-se por não separar os casos clínicos deste estudo consoante a molécula utilizada e o uso de filgrastim e lenograstim foi analisado conjuntamente. No entanto, é importante notar que apenas 5 dos 30 casos clínicos (16,7%) são referentes ao lenograstim, tendo em conta a sua introdução no mercado farmacêutico português no ano de 2014, ao passo que o filgrastim já se encontra autorizado em Portugal desde 1991. A partir

do momento em que ambos se tornaram opções viáveis, a escolha por um ou por outro, no hospital onde decorreu o estudo, dependeu essencialmente da sua disponibilidade comercial. Não obstante, os rhG-CSF são fármacos que apresentam apenas indicações para medicina humana, sendo usados de modo extra-indicação (*off-label*) em medicina veterinária.

Relativamente à caracterização da amostra, é particularmente interessante verificar que a maioria dos animais incluídos no estudo apresenta uma idade bastante jovem, sendo que 46,7% deles (n=14 [9 cães e 5 gatos]) têm idade inferior a um ano. De modo semelhante, 63,3% dos animais (n=19 [9 cães e 10 gatos]) apresentam estatuto reprodutivo fértil. A ocorrência de tais factos é explicada pela grande representatividade de casos clínicos relativos à infeção por parvovírus, tipicamente associada a animais jovens. De facto, os animais com parvovirose canina e panleucopénia felina representaram a principal etiologia na qual se utilizaram rhG-CSF (60,0%), um resultado expectável tendo em conta que são duas doenças infecciosas bastante prevalentes em Portugal. Para além disto, o recurso a rhG-CSF também foi considerado em casos em que surgiu neutropénia secundariamente à administração de fármacos citotóxicos (20,0%), nomeadamente na abordagem quimioterápica a processos neoplásicos, mas também em doenças imunomediadas refratárias à terapêutica convencional imunossupressora. A toxicidade sobre a medula óssea é um efeito adverso que se observa comumente nestes fármacos, tendo em conta que atuam de modo inespecífico em células com alto índice mitótico e, conseqüentemente, causam destruição das células precursoras hematopoiéticas (Carey, 2003; Weiss, 2012; Bailey, 2014). Neste estudo também se utilizaram rhG-CSF em casos em que se verifica hipoplasia da medula óssea (20,0%), englobando este grupo todas as doenças que afetam de modo negativo o processo de multiplicação, diferenciação e/ou maturação das células na medula óssea, não se incluindo as situações caracterizadas por destruição de células hematopoiéticas. Assim sendo, na amostra deste estudo, este grupo é constituído por casos clínicos de infeção pelos retrovírus felinos FIV (33,3%) e FeLV (16,7%), por *E. canis* em fase crónica (16,7%) e por hipoplasia da medula óssea idiopática (33,3%). Relativamente a estes dois últimos casos, foi realizada aspiração medular para avaliação citológica, que revelou hipocelularidade com hipoplasia de todas as linhagens hemáticas, e exclusão de todos os diagnósticos diferenciais de pancitopénia, não tendo sido possível obter um diagnóstico definitivo.

Aquando da apresentação, os animais deste estudo exibiam principalmente neutropénia grave (46,7%), sendo relativamente menos frequentes os casos de neutropénia inicial moderada (33,3%) e ligeira (20,0%). A ocorrência de tais factos pode estar relacionada com o custo que a utilização destes fatores implica. Como são fármacos dispendiosos, o seu uso pode encontrar-se mais reservado para afeções tendencialmente mais graves, não sendo uma abordagem proposta em situações em que a contagem de neutrófilos se encontra diminuída de forma pouco expressiva.

Uma análise por etiologia mostra que 50,0% dos animais com infecção por parvovírus apresentava neutropenia inicial grave, contribuindo essencialmente para tal os felinos e estando os casos de neutropenia moderada e ligeira mais associados à parvovirose canina. Relativamente à neutropenia induzida por fármacos citotóxicos, também 50,0% dos animais exibia neutropenia inicial grave, particularmente devido aos felinos incluídos neste grupo, ao passo que se verificou uma maior variabilidade na contagem absoluta dos neutrófilos nos canídeos. Por último, na hipoplasia medular, o grau de neutropenia observado com maior frequência foi o moderado (50,0%), sendo que neste é nos felinos que se encontram contagens de neutrófilos superiores e estando os casos caninos associados a contagens na ordem dos $0,50 \times 10^3/\mu\text{l}$.

Nesta dissertação, a utilização dos rhG-CSF foi avaliada analiticamente através de hemogramas realizados antes do início do protocolo terapêutico e 48 horas depois (com administrações SID e nunca excedendo os 5 dias). Tendo em conta a rápida resposta aos rhG-CSF descrita nos animais de companhia, com aumentos significativos nas 12-24 horas após a primeira administração (Lothrop et al., 1988; Schuening et al., 1989; Pratt et al., 1990; Félix et al., 2005), a comparação com um hemograma efetuado passadas 48 horas é apropriada, permitindo verificar a ocorrência de resposta. Para além disto, teria sido também interessante avaliar as contagens de neutrófilos após a descontinuação do tratamento, mas tal não foi exequível neste estudo tendo em conta que, apesar de todos os animais terem sido sujeitos a um novo hemograma de controlo, encontrava-se uma grande heterogeneidade relativamente ao período de tempo após a última administração e a realização deste exame. De modo a avaliar a significância das alterações hematológicas encontradas foi realizada análise estatística dos vários parâmetros dos hemogramas através do *Wilcoxon Signed-Rank Test*, utilizando como nível de significância $p < 0,05$.

Na amostra dos animais com infecção por parvovírus foram encontrados valores de $p < 0,05$ nos parâmetros leucócitos totais, neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos e eritrócitos, o que significa que, para estes, há evidências que permitem rejeitar a H_0 e, como tal, as alterações verificadas poderão eventualmente ser causadas pelo tratamento com rhG-CSF. De acordo com a estatística descritiva denotam-se aumentos particularmente relevantes nos leucócitos totais [que subiram de $2,01 (\pm 1,07)$ para $17,53 (\pm 16,10) \times 10^3/\mu\text{l}$] e nos neutrófilos [os quais subiram de $1,02 (\pm 0,83)$ para $13,95 (\pm 14,09) \times 10^3/\mu\text{l}$]. Relativamente aos monócitos, registou-se uma subida de $0,09 (\pm 0,06)$ para $1,09 (\pm 1,39) \times 10^3/\mu\text{l}$, sendo que esta alteração já tinha sido previamente associada à administração de rhG-CSF (Lothrop et al., 1988; Schuening et al., 1989; Fulton et al., 1991; Félix et al., 2005). Contudo, apenas um estudo efetuado em gatos saudáveis refere um aumento significativo na contagem de linfócitos (Fulton et al., 1991), tal como verificado na presente dissertação [tendo o número de linfócitos subido de $0,86 (\pm 0,43)$ para $2,34 (\pm 1,43) \times 10^3/\mu\text{l}$]. Pelo contrário, em nenhum dos estudos anteriores se tinham verificado aumentos significativos nos eosinófilos. No que

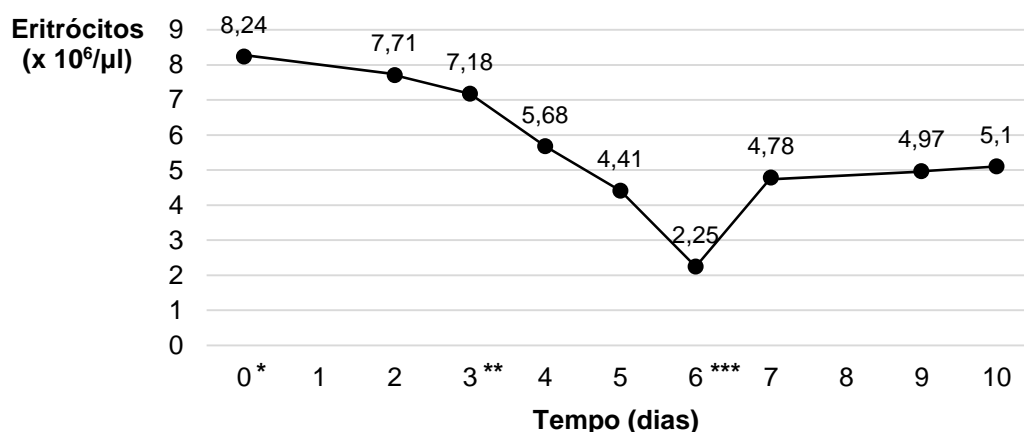
concerne aos eritrócitos, não havendo também nenhum efeito descrito dos rhG-CSF sobre este parâmetro, no qual se registou uma diminuição de $7,24 (\pm 1,53)$ para $6,35 (\pm 1,52) \times 10^6/\mu\text{l}$, a significância desta alteração poderá dever-se à instituição de fluidoterapia que permitiu corrigir a desidratação e, conseqüentemente, a hemoconcentração, achados clínicos comumente encontrados nos animais com infecção por parvovírus. Relativamente aos basófilos e plaquetas, obtiveram-se valores de $p \geq 0,05$, pelo que não se rejeita a H_0 .

De lembrar que no âmbito da parvovirose canina e da panleucopénia felina os estudos que têm sido realizados apresentam conclusões contraditórias (Kraft & Kuffer, 1995; Rewerts et al., 1998; Mischke et al., 2001; Félix et al., 2005). Os resultados desta dissertação sugerem, contudo, que a utilização de rhG-CSF parece ser responsável por um aumento relevante na contagem de leucócitos totais e neutrófilos, tanto nos casos de parvovirose canina, como felina. Considerando que existe uma relação comprovada entre o número de leucócitos totais e a taxa de sobrevivência de animais com enterite por parvovírus, estando a grande mortalidade associada a esta afeção relacionada com a maior suscetibilidade a infecções secundárias e risco de sépsis em casos de leucopénia grave (Mischke et al., 2001; Félix et al., 2005), é possível depreender que o recurso a rhG-CSF pode apresentar particular importância na evolução favorável desta doença. De acordo com os resultados deste estudo, a utilização destes fatores hematopoiéticos pode ser, por isso, considerada como uma medida terapêutica de suporte que permite reforçar a curto prazo o sistema imunitário. Apesar de ter sido demonstrado que o G-CSF endógeno já se encontra aumentado em cães com neutropénia causada por parvovirose (Cohn et al, 1999), não se pode excluir que a administração de rhG-CSF possa causar um efeito adicional no aumento da contagem de neutrófilos. Segundo Mischke et al. (2001), a administração de rhG-CSF pode estar associada a efeitos particularmente benéficos em animais com infecção por parvovírus quando instituída precocemente, antes do desenvolvimento de leucopénia. Em casos de leucopénia grave, a depleção de células precursoras hematopoiéticas na medula óssea com recetores para o G-CSF pode ser de tal modo extensa que já não se obtém resposta a tal terapêutica. As observações feitas no estudo de Félix et al. (2005) apoiam esta afirmação, na medida em que o único gato que não respondeu à administração de rhG-CSF e que sucumbiu à panleucopénia felina foi aquele que iniciou a terapêutica mais tardiamente. Sendo a parvovirose canina e a panleucopénia felina doenças infecciosas bastante frequentes e com alta mortalidade associada devido ao desenvolvimento de sépsis, é importante alcançar um consenso sobre a utilidade de rhG-CSF nestas afeções e sobre o momento ideal da sua administração. Para tal, seria interessante proceder a mais estudos nesse sentido.

Por sua vez, a análise estatística das alterações hematológicas do grupo com neutropénia causada por fármacos citotóxicos revelou a ocorrência de valores de $p < 0,05$ nos parâmetros leucócitos totais, neutrófilos e eritrócitos, verificando-se uma subida dos leucócitos totais [de $2,42 (\pm 2,12)$ para $8,99 (\pm 3,74) \times 10^3/\mu\text{l}$] e dos neutrófilos [de $1,05 (\pm 1,00)$ para $6,85 (\pm 3,25)$].

x $10^3/\mu\text{l}$]. Relativamente aos eritrócitos, a alteração registada consistiu na sua diminuição de 6,57 ($\pm 2,54$) para 5,26 ($\pm 2,18$) x $10^6/\mu\text{l}$. Uma análise individual dos casos mostra que a significância encontrada neste parâmetro se deveu possivelmente a um caso referente a uma cadela com trombocitopénia imunomediada (TIM) não responsiva à corticoterapia e à ciclosporina e sem história prévia de anemia nos hemogramas regulares que efetuou para monitorização da contagem de plaquetas. Como advogado em casos refratários, foi administrada vincristina para estimular a libertação de plaquetas (Ramsey, 2014). Contudo, três dias depois o animal apresentou-se a uma consulta com sinais hemorrágicos (hematemese, melena e hematúria) e neutropénia, momento em que se iniciou filgrastim, para além da restante terapêutica. Passados 2 dias, o hemograma revelou anemia normocítica e normocrómica, encontrando-se no gráfico 9 a evolução da contagem de eritrócitos deste animal. Tendo em conta que as repercussões da vincristina na produção dos eritrócitos não se revelam em tão curto período de tempo e que os rhG-CSF nunca foram associados a uma diminuição dos eritrócitos, é possível excluir que a causa da anemia verificada tenha origem farmacológica; adicionalmente, o facto de surgir poucos dias após episódios de hemorragias sugere que a anemia se deva à perda de sangue.

Gráfico 9: Evolução da contagem de eritrócitos na cadela com TIM.



Legenda: * = administração de vincristina (0,02 mg/kg IV); ** = administração de filgrastim (5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ IV, 3 dias); *** = transfusão de concentrado de eritrócitos.

Assim, esta dissertação indica que a administração de rhG-CSF em animais com neutropénia secundária a fármacos citotóxicos parece ser responsável por um aumento na contagem de neutrófilos de forma mais célere, o que permite reverter a neutropénia mais rapidamente, à semelhança do que já foi observado em estudos de medicina humana (Crawford et al., 1991; Pentengell et al., 1992; Trillet-Lenoir et al., 1993; Zinzani et al., 1994). Em medicina veterinária, na área de oncologia, o uso de rhG-CSF apenas foi testado num estudo, no qual a contagem de leucócitos totais aumentou de modo significativo (Kraft & Kuffer, 1995). Está descrito que na maioria dos casos, os cães e os gatos recuperam espontaneamente da neutropénia em 3-5 dias, podendo demorar mais tempo em gatos com neutropénia grave (Bailey, 2014). Nos

animais deste estudo, verificou-se que o recurso a rhG-CSF foi associado a uma correção da neutropénia nas primeiras 48 horas após o início do protocolo na totalidade dos animais da amostra com neutropénia induzida por fármacos citotóxicos.

Por fim, na amostra de animais com hipoplasia medular ocorreram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) apenas nos parâmetros leucócitos totais e neutrófilos, registando-se uma subida de $2,20 (\pm 1,29)$ para $7,71 (\pm 9,52) \times 10^3/\mu\text{l}$ nos leucócitos totais e de $1,21 (\pm 0,73)$ para $5,43 (\pm 6,51) \times 10^3/\mu\text{l}$ nos neutrófilos. Relativamente aos restantes parâmetros hematológicos não foi possível rejeitar a H_0 ($p \geq 0,05$).

A título individual, cada animal foi classificado como tendo respondido ou não, segundo o critério estabelecido de, ao fim de 48 horas do início do tratamento, o hemograma revelar recuperação da neutropénia, demonstrada através de uma contagem de neutrófilos absolutos igual ou superior a $3,00 \times 10^3/\mu\text{l}$ nos cães e $2,50 \times 10^3/\mu\text{l}$ nos gatos, com concomitante aumento percentual igual ou superior a 100%. Deste modo, verificou-se que a taxa de resposta para o total da amostra foi de 73,3%, sendo que, apesar da taxa de resposta aos rhG-CSF ter sido superior nos felídeos (81,2%) comparativamente aos canídeos (64,3%), esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,417$), o que significa que o facto de haver ou não resposta é independente da espécie.

Neste estudo pretendeu-se ainda verificar a existência de associação entre a taxa de resposta aos rhG-CSF e outras variáveis registadas.

Assim sendo, foi encontrada uma associação estatisticamente significativa ($p = 0,041$) entre a etiologia e a taxa de resposta. Considerando o grupo de animais com infeção por parvovírus, este estudo mostrou que a maioria ($n=14$; 77,8%) respondeu aos rhG-CSF, sendo 6 casos referentes a parvovirose canina e 8 a panleucopénia felina. Dos animais aos quais foram administrados fármacos citotóxicos, todos responderam positivamente, obtendo-se uma taxa de resposta de 100,0%, o que mostra que a utilização de rhG-CSF nesta área pode apresentar uma aplicabilidade promissora. Tal observação pode revestir-se de maior importância no contexto atual, em que a população de animais de companhia apresenta uma maior esperança de vida e, conseqüentemente, a prevalência de doenças associadas a animais geriátricos (de entre as quais se destacam as oncológicas) tem aumentado (Withrow, Vail & Page, 2013). Sendo a quimioterapia um dos pilares da terapêutica antineoplásica, a maior utilização de fármacos citotóxicos pode vir acompanhada da necessidade em recorrer a rhG-CSF de forma terapêutica para reverter os casos de neutropénia e, eventualmente, de modo profilático, o que vai permitir a aplicação de protocolos com doses mais elevadas ou em sessões menos espaçadas.

Relativamente ao grupo de animais com hipoplasia medular, a maioria destes (66,7%) não respondeu aos rhG-CSF. Todavia, dada a grande variedade de afeções incluídas, torna-se relevante analisar cada uma por si. Assim, dos casos referentes às retrovirose felinas, ocorreu reversão da neutropénia num dos dois gatos com FIV, à semelhança dos resultados

obtidos por Phillips et al. (2005), enquanto o outro não conseguiu responder à administração. Para além disto, também se verificou que o gato com FeLV respondeu positivamente a esta terapêutica, não havendo estudos acerca do uso de rhG-CSF nesta afeição. Considerando o pequeno número de gatos com infeção pelos retrovírus felinos FIV e FeLV a que foram administrados rhG-CSF não é possível estabelecer neste estudo qualquer conclusão acerca do seu uso nestas doenças, no entanto dado os resultados positivos comunicados (Phillips et al., 2005) seria interessante averiguar a sua utilização numa amostra constituída por um maior número de gatos. Tal como no caso clínico descrito por Aroch e Harrus (2001), também o cão com hipoplasia medular causada por infeção por *E. canis* não respondeu à administração de rhG-CSF, mantendo a pancitopénia. Para além deste, também os animais com hipoplasia medular idiopática falharam em responder. A ausência de resposta observada nestes animais pode dever-se a uma falta de células progenitoras hematopoiéticas ou a um microambiente medular (estroma) inóspito que prejudica a hematopoiese.

Dado que a presença de neutropénia grave se encontra associada a uma depleção marcadamente extensa da população de neutrófilos na medula óssea, seja por consumo excessivo a nível periférico responsável por uma maior libertação compensatória, seja por uma deficiente produção, colocou-se a hipótese de que poderia estar associada a uma menor taxa de resposta devido ao esgotamento de reservas. Porém, não se verificou significado estatístico nesta associação ($p = 0,081$); pelo contrário, o cruzamento dos dados mostrou que 54,5% dos animais que responderam aos rhG-CSF exibiam neutropénia grave e 50,0% dos animais que não responderam apresentavam inicialmente neutropénia de grau ligeiro. Como tal, aquando da realização do hemograma pré-tratamento, o grau de neutropénia inicial não permite aferir sobre a resposta.

Foi ainda objetivo averiguar a associação da taxa de resposta com o desfecho clínico dos animais, que foram classificados como tendo alta médica ou sofrido óbito, verificando-se um resultado estatisticamente significativo ($p = 0,001$). Esta observação é particularmente relevante, pois o facto de haver resposta com reversão da neutropénia às 48 horas pode ser encarado como indicador de bom prognóstico. Fazendo referência aos dois casos em que se registou uma resposta na contagem de neutrófilos, mas que culminaram no óbito dos animais, é relevante mencionar que este se deveu à doença primária, tendo ocorrido morte natural no cão com linfoma multicêntrico e sido solicitada eutanásia na cadela com TIM devido a um deterioramento do estado clínico.

Por último, ressalva-se que em todos os casos clínicos incluídos neste estudo foram cumpridas as recomendações de tratamentos a curto prazo, não excedendo os 5 dias, pelo que em nenhum se coloca a problemática do desenvolvimento de anticorpos neutralizantes. Todavia, em nenhuma das situações incluídas foi necessário recorrer a uma terapêutica crónica. Nestes casos, o ideal seria utilizar as formas recombinantes específicas de espécie, nas quais não se observou o desenvolvimento de anticorpos (Obradovich et al., 1991;

Obradovich et al., 1993; Yamamoto et al., 2002; Coleman et al., 2014). No entanto, estas não se encontram hoje comercialmente disponíveis, mas podem tornar-se em opções terapêuticas no futuro.

Capítulo IV - Conclusão

Atualmente a utilização de rhG-CSF em medicina veterinária ainda se reveste de controvérsia, dada a escassez de evidência científica que permita fundamentar o seu uso. Como tal, a presente dissertação pretendeu contribuir para o estudo da administração destes fármacos na clínica de animais de companhia, tendo sido avaliado o seu efeito em várias afeções associadas a neutropénia, nomeadamente em casos de infeção por parvovírus, mielossupressão induzida por fármacos quimioterápicos citotóxicos e hipoplasia da medula óssea.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a utilização de rhG-CSF nas espécies canina e felina pode apresentar efeitos terapêuticos benéficos a nível hematológico, uma vez que a sua instituição foi associada a aumentos estatisticamente significativos nas contagens de leucócitos totais e neutrófilos nos três grupos. Sendo os neutrófilos importantes células de defesa do hospedeiro, é fácil depreender que a neutropénia é responsável por uma diminuição da competência do sistema imunitário e, conseqüentemente, está associada a um maior risco de infeções secundárias potencialmente fatais. Deste modo, os rhG-CSF, ao induzirem um aumento na contagem dos neutrófilos, tornam-se úteis por permitirem reduzir a morbilidade e mortalidade dos doentes com neutropénia e auxiliarem na sua recuperação.

Para além do impacto positivo no número de neutrófilos, foi também observado um aumento estatisticamente significativo nas contagens de monócitos, linfócitos e eosinófilos na amostra de animais com infeção por parvovírus. Uma diminuição na contagem de eritrócitos foi também encontrada no grupo de animais com infeção por parvovírus e neutropénia induzida por fármacos citotóxicos, mas o seu significado é questionável.

Neste estudo teria sido também interessante avaliar os resultados de um hemograma efetuado após a descontinuação da terapêutica com rhG-CSF, de modo a perceber se os animais desta amostra conseguiram manter o número de neutrófilos estável e dentro dos valores de referência ou se, em consequência de doenças crónicas, ocorreu retorno da neutropénia. Contudo, tal não foi exequível devido a uma grande diferença nos períodos de tempo entre a última administração e a realização de um novo hemograma de controlo, o que limita a autenticidade de uma possível comparação.

Como segunda parte deste estudo foi feita uma análise individual dos casos clínicos, a partir da qual se verificou que a taxa de resposta aos rhG-CSF na totalidade dos animais da amostra foi de 73,3%. Apesar de esta ter sido superior nos felídeos que nos canídeos, esta diferença não foi significativa.

Nesta dissertação foi ainda investigada a associação entre a taxa de resposta e outras variáveis registadas, tendo-se encontrado uma associação com a etiologia e o desfecho clínico. Assim, verificou-se que a taxa de resposta foi particularmente alta nos animais com infeção por parvovírus (77,8%) e com neutropénia secundária à administração de fármacos

quimioterápicos (100,0%), sugerindo-se a menor resposta observada nos casos de hipoplasia medular (33,3%) pelo facto da medula óssea se encontrar afetada e, como tal, menos capaz de desencadear uma resposta eficiente aos rhG-CSF. Relativamente ao desfecho clínico, observou-se que a maioria dos animais que responderam à administração de rhG-CSF tiveram alta clínica e os que não responderam sofreram óbito (por morte natural ou eutanásia). No entanto, não foi encontrada uma associação entre a taxa de resposta e o grau de neutropénia inicial.

Considerando que os rhG-CSF são fármacos dispendiosos, a sua administração exige uma ponderação individual de cada caso clínico (baseada numa análise do custo-benefício esperado) e consentimento dos proprietários dos animais, o que limita a sua utilização em medicina veterinária. Todavia, apesar da pequena amostra estudada, esta dissertação sugere que, enquanto não se encontrarem disponíveis no mercado farmacêutico fatores estimuladores de colónias de granulócitos específicos de espécie, as formas recombinantes humanas podem ser encaradas como alternativas eficazes nos canídeos e felídeos em protocolos de curta duração quando se pretende reduzir a gravidade e a duração de um episódio de neutropénia. Para além disto, neste estudo, não só os rhG-CSF apresentaram efeitos terapêuticos promissores, como também não se registaram quaisquer reações adversas dignas de registo, tendo sido a sua administração bem tolerada.

No futuro, perspetiva-se que, à medida que estes fármacos vão sendo utilizados no âmbito da clínica dos animais de companhia, sejam publicados mais trabalhos científicos a descrever a sua eficácia com base em amostras populacionais maiores. Deste modo, vai ser possível aumentar o conhecimento acerca do uso de rhG-CSF em várias afeções, permitindo cada vez mais uma maior segurança na sua administração. A realização de mais estudos torna-se particularmente necessária em doenças altamente prevalentes e com grande mortalidade associada devido à ocorrência de sépsis, nomeadamente na parvovirose canina e panleucopénia felina, nas quais o uso de rhG-CSF não tem reunido consenso.

Capítulo V - Bibliografia

- Abrams-Ogg, A. (2000). Neutropenia. In M. Day, A. Mackin & J. Littlewood (Eds.), *Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. (pp. 117-128). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Alexandre, N., Santos, A.S., Núncio, M.S., Sousa, R., Boinas, F. & Bacellar, F. (2008). Detection of *Ehrlichia canis* by polymerase chain reaction in dogs from Portugal, *The Veterinary Journal*, 181, 343-344.
- Allison, R.W. (2010). Challenging cases: bone marrow disorders in cats & dogs. In *2010 American College of Veterinary Internal Medicine Forum Proceedings*. California. Acedido através do VIN (<http://www.vin.com>) em 20 de Maio de 2016.
- Andrès, E., Kurtz, J.E., Perrin, A.E., Dufour, P., Schlienger, J.L. & Maloisel, F. (2001). Haematopoietic growth factor in antithyroid-drug-induced agranulocytosis, *The Quarterly Journal of Medicine*, 94, 423-428.
- Andrès, E., Maloisel, F., Kurtz, J.E., Kaltenbach, G., Alt, M., Weber, J.C., Sibilia, J., Schlienger, J.L., Blicklé, J.F., Brogard, J.M. & Dufour, P. (2002). Modern management of non-chemotherapy drug-induced agranulocytosis: a monocentric cohort study of 90 cases and review of the literature, *European Journal of Internal Medicine*, 13, 324-328.
- Aroch, I. & Harrus, S. (2001). The use of recombinant human granulocyte colony stimulating factor and recombinant human erythropoietin in the treatment of severe pancytopenia due to canine monocytic ehrlichiosis, *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 56(2), 65-69.
- Bailey, D.B. (2014). Treatment of adverse effects from cancer therapy. In J.D. Bonagura & D.C. Twedt (Eds.), *Kirk's Current Veterinary Therapy*. (15ª edição). (pp. 330-331). Missouri: Saunders Elsevier.
- Balkin, M.S., Buchholtz, M., Ortiz, J. & Green, A.J. (1993). Propylthiouracil (PTU)-induced agranulocytosis treated with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), *Thyroid*, 3(4), 305-309.
- Barr, S.C. (2013). Update on canine parvovirus. In *Proceedings of Central Veterinary Conference*. Kansas. Acedido através do VIN (<http://www.vin.com>) em 9 de Maio de 2016.
- Beauchesne, M.F. & Shalansky, S.J. (1999). Nonchemotherapy drug-induced agranulocytosis: a review of 118 patients treated with colony-stimulating factors, *Pharmacotherapy*, 299-305.
- Bienzle, D. (2000). Collection and interpretation of bone marrow samples. In M. Day, A. Mackin & J. Littlewood (Eds.), *Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. (pp. 19-24). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Boesch, A., Cattori, V., Riand, B., Willi, B., Meli, M.L., Rentsch, K.M., Hosie, M.J., Hofmann-Lehmann, R. & Lutz, H. (2015). Evaluation of the effect of short-term treatment with the integrase inhibitor raltegravir (Isentress™) on the course of progressive feline leukemia virus infection, *Veterinary Microbiology*, 175, 167-178.

- Bolis, S., Cocorocchio, E., Corti, C., Ferreri, A.J.M., Frungillo, N., Grillo, G., Omodeo, E.S., Tedeschi, L. & Zilioli, V.R. (2013). Clinical implications, safety, efficacy of recombinant human Granulocyte Colony-Stimulating Factors and pegylated equivalent, *Epidemiology Biostatistics and Public Health*, 10(4), 1-16.
- Boudreaux, B. (2014). Antimicrobial use in the veterinary cancer patient, *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 44, 883-891.
- Brewer, W.G. (2003). Preventing and treating chemotherapy toxicity. In *Proceedings of Western Veterinary Congress*. Acedido através do VIN (<http://www.vin.com>) em 18 de Maio de 2016.
- Brown, C.D., Parnell, N.K., Schulman, R.L., Brown, C.G., Glickman, N.W. & Glickman, L. (2006). Evaluation of clinicopathologic features, response to treatment, and risk factors associated with idiopathic neutropenia in dogs: 11 cases (1990-2002), *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(1), 87-91.
- Brown, M.R. & Rogers, K.S. (2001a). Neutropenia in dogs and cats, *Compendium*, 23(6), 534-543.
- Brown, M.R. & Rogers, K.S. (2001b). Neutropenia in dogs and cats: a retrospective study of 261 cases, *Journal of the American Animal Hospital Association*, 37, 131-139.
- Cardoso, L., Mendão, C. & Madeira de Carvalho, L. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study, *Parasites & Vectors*, 5:62.
- Carey, P.J. (2003). Drug-induced myelosuppression: diagnosis and management, *Practical Drug Safety*, 26(10), 691-706.
- Cattori, V., Weibel B. & Lutz H. (2011). Inhibition of feline leukemia virus replication by the integrase inhibitor Raltegravir, *Veterinary Microbiology*, 152, 165-168.
- Claus, M.A. (2015). Febrile neutropenia. In D.C. Silverstein & K. Hopper, *Small Animal Critical Care Medicine*. (2ª edição). (pp. 466-472). Missouri: Saunders Elsevier.
- Cohn, L.A., Rewerts, J.M., McCaw, D., Boon, G.D., Wagner-Mann, C. & Lothrop, C.D. (1999). Plasma granulocyte colony-stimulating factor concentrations in neutropenic, parvoviral enteritis-infected puppies, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13, 581-586.
- Coleman, J.K., Sakagawa, Y., Tanabe, T., Offner, M.J., Noon-Song, E.N., Coisman, J.G., Roff, S.R., Kondo, H., Yamamoto, J.K. & Abbott, J.R. (2014). Pegylated feline granulocyte colony-stimulating factor increases neutrophil levels in cats, *The Veterinary Journal*, 200, 44-50.
- Crawford, J., Ozer, H., Stoller, R., Johnson, D., Lyman, G., Tabbara, I., Grous, J., Picozzi, V., Rausch, G., Smith, R., Gandishar, W., Yahanda, A., Vincent, M., Stewart, M. & Glaspy, J. (1991). Reduction by granulocyte colony-stimulating factor of fever and neutropenia induced by chemotherapy in patients with small cell lung cancer, *The New England Journal of Medicine*, 325(3), 164-170.
- Crawford, P.C. & Sellon, R.K. (2010). Canine parvovirus. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman, *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Volume 1*. (7ª edição). Missouri: Saunders Elsevier.

- Dale, D.C. (2002). Hematopoietic growth factors for the treatment of severe chronic neutropenia, *Stem Cells*, 13, 94-100.
- Dale D.C. & Graw, R.G. Jr (1974). Transplantation of allogenic bone marrow in canine cyclic neutropenia [abstract], *Science*, 183(4120), 83-84.
- Day, M.J., Horzinek, M.C., Schultz, R.D. & Squires, R.A. (2015). WSAVA guidelines for the vaccination of dogs and cats, *Journal of Small Animal Practice*, 57, 1-45.
- Duarte, A., Castro, I., Fonseca, I.M.P., Almeida, V., Madeira de Carvalho, L.M., Meireles, J., Fazendeiro, M.I., Tavares, L. & Vaz, Y. (2009). Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal, *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12, 441-446.
- Duffy, A., Dow, S., Ogilvie, G., Rao, S. & Hackett, T. (2009). Hematologic improvement in dogs with parvovirus infection treated with recombinant canine granulocyte-colony stimulating factor, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 33, 352-356.
- Dunham, S. P., & Graham, E. (2008). Retroviral infections of small animals, *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 38(4), 879-901.
- Dunn, J. (2000). Disorders of leucocyte number. In M. Day, A. Mackin & J. Littlewood (Eds.), *Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. (pp. 93-104). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- European Medicines Agency (2016). *Tevagrastim: Resumo das características do medicamento*. Acedido em 4 de Maio de 2016, disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000827/WC500036664.pdf
- Félix, N., Vilela, C.L. & Niza, M.M.R.E. (2005). Clinical use of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in 7 cats with natural viral panleucopenia infection, *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, 40, 71-75.
- Fenimore, A. (2014). Update on feline retrovirus infections. In *Proceedings of Atlantic Coast Veterinary Conference*. Acedido através do VIN (<http://www.vin.com>) em 20 de Maio de 2016.
- Fontaine, S. (2014). Nursing the neutropenic patient. In *Proceedings of British Small Animal Veterinary Congress*. Acedido através do VIN (<http://www.vin.com>) em 15 de Abril de 2016.
- Frazão, P.S.G.S. (2008). *Alterações leucocitárias como factor de prognóstico na evolução clínica da parvovirose canina: 191 casos*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Frimberger, A.E. (2011). Chemotherapy in private practice part 2. In *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings*. Acedido através do VIN (<http://www.vin.com>) em 18 de Maio de 2016.
- Frimberger, A.E. & Moore, A.S. (2009). Support for the neutropenic cancer patient, *Clinician's Brief*, 55-57. Acedido em 18 de Maio de 2016, disponível em: <http://www.cliniciansbrief.com/sites/default/files/sites/cliniciansbrief.com/files/SupportfortheNeutropenicCancerPatient.pdf>

- Fujino, Y., Horiuchi, H., Mizukoshi, F., Baba, K., Goto-Koshino, Y., Ohno, K. & Tsujimoto, H. (2008). Prevalence of hematological abnormalities and detection of infected bone marrow cells in asymptomatic cats with feline immunodeficiency virus infection, *Veterinary Microbiology*, 136, 217-225.
- Fulton, R., Gasper, P.W., Ogilvie, G.K., Boone T.C. & Dornsife, R.E. (1991). Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoiesis in normal cats [abstract], *Experimental Hematology*, 19(8), 759-767.
- Gil, S., Leal, R.O., McGahie, D., Sepúlveda, N., Duarte, A., Niza, M.M.R.E. & Tavares, L. (2013). Oral recombinant feline Interferon-omega as an alternative immune modulation therapy in FIV positive cats: clinical and laboratory evaluation, *Research in Veterinary Science*, 95, 79–85.
- Gleich, S. & Hartmann, K. (2009). Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23, 552-558.
- Glickman, L.T., Domanski, L.M., Patronek, G.J. & Visintainer, F. (1985). Breed-related risk factors for canine parvovirus enteritis, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 187(6), 589-594.
- Goddard, A., Leisewitz, A.L., Christopher, M.M., Duncan, N.M. & Becker, P.J. (2008). Prognostic usefulness of blood leukocyte changes in canine parvoviral enteritis, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22, 309-316.
- Greene, C.E. (2012). Feline enteric viral infections. In C.E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4ª edição). (pp. 80-90). Missouri: Saunders Elsevier.
- Greene, C.E. & Calpin, J. (2012). Antimicrobial drug formulary. In C.E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4ª edição). (pp. 1253). Missouri: Saunders Elsevier.
- Greene, C.E. & Decaro, N. (2012). Canine viral enteritis. In C.E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4ª edição). (pp. 67-75). Missouri: Saunders Elsevier.
- Gregory, C.R. (2014). Immunosuppressive agents. In J.D. Bonagura & D.C. Twedt (Eds.), *Kirk's Current Veterinary Therapy*. (15ª edição). (pp. 268). Missouri: Saunders Elsevier.
- Guariglia, R., Martorelli, M.C., Lerose, R., Telesca, D., Milella, M.R. & Musto, P. (2016). Lipegfilgrastim in the management of chemotherapy-induced neutropenia of cancer patients, *Biologics: Targets and Therapy*, 10, 1-8.
- Hammond, W.P., Boone, T.C., Donahue, R.E., Souza, L.M. & Dale, D.C. (1990). A comparison of treatment of canine cyclic hematopoiesis with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), G-CSF, interleukin-3, and canine G-CSF, *Blood*, 76(3), 523-532.
- Hammond, W.P., Csiba, E., Canin, A., Hockman, H., Souza, L.M., Layton, J.E. & Dale, D.C. (1991). Chronic neutropenia: a new canine model induced by human granulocyte colony-stimulating factor, *Journal of Clinical Investigation*, 87, 704-710.
- Hammond, W.P., Price, T.H., Souza, L.M. & Dale, D.C. (1989). Treatment of cyclic neutropenia with granulocyte colony-stimulating factor [abstract], *The New England Journal of Medicine*, 320(20), 1306-1311.

- Haney, S.M., Beaver, L., Turrel, J., Clifford, C.A., Klein, M.K., Crawford, S. & Poulson, J.M. (2009). Survival analysis of 97 cats with nasal lymphoma: a multi-institutional retrospective study (1986-2006), *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23, 287-294.
- Harrus, S., Waner, T. & Neer, T.M. (2012). *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections: *Ehrlichia canis* infection. In C.E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4ª edição). (pp. 227-238). Missouri: Saunders Elsevier.
- Hartmann, K. (2012). Feline leukemia virus infection. In C.E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4ª edição). (pp. 108-136). Missouri: Saunders Elsevier.
- Harvey, J.W. (2012). *Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*. Missouri: Saunders Elsevier.
- Hermans, P., Rozenbaum, W., Jou, A., Castelli, F., Borleffs, J., Gray, S., Ward, N., Gori, A., De Bona, A., Ferré, C., Loncà, M., Lang, J.M., Ammassari, A. & Clumeck, N. (1996). Filgrastim to treat neutropenia and support myelosuppressive medication dosing in HIV infection [abstract], *AIDS*, 10(4), 1627-1633.
- Holland, M., Stobie, D. & Shapiro, W. (1996). Pancytopenia associated with administration of captopril to a dog [abstract], *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 208(10), 1683-1686.
- Hosie, M.J., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinek, M.C. (2009). Feline immunodeficiency: ABCD guidelines on prevention and management, *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, 575-584.
- Hosing, C. (2012). Hematopoietic stem cell mobilization with G-CSF. In M.G. Kolonin & P.J. Simmons (Eds.), *Stem Cell Mobilization: Methods and Protocols*. (pp. 37-47). USA: Springer Science.
- Houston, D.M., Ribble, C.S. & Head, L.L. (1996). Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991) [abstract], *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 208(4), 542-546.
- Ibáñez, L., Sabaté, M., Ballarín, E., Puig, R., Vidal, X. & Laporte, J.R. (2008). Use of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and outcome in patients with non-chemotherapy agranulocytosis, *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 17, 224-228.
- Jackson, M.L. (2010). Leukocytes in Health and Disease. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman, *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Volume 1*. (7ª edição). Missouri: Saunders Elsevier.
- Jacobs, G., Calvert, C. & Kaufman, A. (1998). Neutropenia and thrombocytopenia in three dogs treated with anticonvulsants, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 212(5), 681-684.
- Jung, H., Kang, M. & Park, H. (2015). Drug-induced blood cell dyscrasia associated with phenobarbital administration in a dog, *Korean Journal of Veterinary Research*, 55(4), 263-266.
- Junqueira, L.C. & Carneiro J. (2008). *Histologia Básica*. (11ª edição). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

- Kearns, S.A. & Ewing, P. (2006). Causes of canine and feline pancytopenia, *Compendium*, 28(2), 122-134.
- Kimura, S., Matsuda, J., Ikematsu, S., Miyazono, K., Ito, A., Nakahata, T., Minamitani, M., Shimada, K., Shiokawa, Y. & Takaku, F. (1990). Efficacy of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia in patients with AIDS [abstract], *AIDS*, 4(12), 1251-1255.
- Kraft, W. & Kuffer, M. (1995). Treatment of severe neutropenias in dogs and cats with Filgrastim [abstract], *Tierärztliche Praxis*, 23(6), 609-613.
- Kroschinsky, F., Hölig, K., Poppe-Thiede, K., Zimmer, K., Ordemann, R., Blechschmidt, M., Oelschlaegel, U., Bornhauser, M., Rall, G., Rutt, C. & Ehninger, G. (2005). Single-dose pegfilgrastim for the mobilization of allogeneic CD34+ peripheral blood progenitor cells in healthy family and unrelated donors, *Haematologica*, 90(12), 1665-1671.
- Kruse, B.D., Unterer, S., Horlacher, K., Sauter-Louis, C. & Hartmann, K. (2010). Prognostic factors in cats with feline panleukopenia, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24, 1271-1276.
- Kuritzkes, D.R., Parenti, D., Ward, D.J., Rachlis, A., Wong, R.J., Mallon, K.P., Rich, W.J. & Jacobson, M.A. (1998). Filgrastim prevents severe neutropenia and reduces infective morbidity in patients with advanced HIV infection: results of a randomized, multicenter, controlled trial [abstract], *AIDS*, 12(1), 65-74.
- Lanevski, A., Daminet, S., Niemeyer, G.P. & Lothrop, C.D. Jr, (1999). Granulocyte colony-stimulating factor deficiency in a Rottweiler with chronic idiopathic neutropenia, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13, 72-75.
- Lieschke, J.G., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., Fowler, K.J., Basu, S., Zhan, Y.F. & Dunn, A.R. (1994). Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization, *Blood*, 84(6), 1737-1746.
- Litster, A.L. (2014). Feline panleukopenia: what the ER clinician should know. In *Proceedings of International Veterinary Emergency and Critical Care Symposium*. Acedido através do VIN (<http://www.vin.com>) em 9 de Maio de 2016.
- Lothrop, C.D., Warren, D.J., Souza, L.M., Jones, J.B. & Moore, M.A.S. (1988). Correction of canine cyclic hematopoiesis with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, *Blood*, 72(4), 1324-1328.
- Lutz, H., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinek, M.C. (2009). Feline leukaemia: ABCD guidelines on prevention and management, *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, 565-574.
- MacLachland, N.J. & Dubovi, E.J. (Eds.) (2011). Retroviridae. In *Fenner's Veterinary Virology*. (4ª edição). (pp. 243-274). California: Elsevier.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D.B. & Roitt, I. (2006). *Immunology*. (7ª edição). Philadelphia: Elsevier.
- Mani, S., Barry, M. & Concato, J. (1993). Granulocyte-colony stimulating factor therapy in drug-induced agranulocytosis, *Archives of Internal Medicine*, 153, 2500-2501.

- McManus, P.M., Litwin, C. & Barber, L. (1999). Immune-mediated neutropenia in 2 dogs, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13, 372-374.
- Mendes Neto, E.C., Gruchouskei, L., Viott, A.M., Nunes, A.C.B., Fukushima, F.B. & Oyafuso, M.K. (2013). Anemia mielotísica por osteopetrose em um cão: relato de caso, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(5), 1291-1296.
- Messick, J. (2006). Blood and bone marrow. In J.A. Eurell & B.L. Frappier, *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*. (6ª edição). (pp. 61-78). Iowa: Blackwell Publishing.
- Miranda, C., Parrish, C.R. & Thompson G. (2014). Canine Parvovirus 2c Infection in a Cat with Severe Clinical Disease, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(3), 462-464.
- Mischke, R., Barth, T., Wohlseion, P., Rohn, K. & Nolte, I. (2001). Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) on leukocyte count and survival rate of dogs with parvoviral enteritis, *Research in Veterinary Science*, 70, 221-225.
- Mohr, A.J., Leisewitz, A.L., Jacobson, L.S., Steiner, J.M., Ruaux, C.G. & Williams, D.A. (2003). Effect of early enteral nutrition on intestinal permeability, intestinal protein loss and outcome in dogs with severe parvoviral enteritis, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17, 791-798.
- Mueller, B.U., Jacobsen, F., Butler, K.M., Husson, R.N., Lewis, L.L. & Pizzo, P.A. (1992). Combination treatment with azidothymidine and granulocyte colony-stimulating factor in children with human immunodeficiency virus infection [abstract], *Journal of Pediatrics*, 121(5), 797-802.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., & Studdert, M.J. (1999). Retroviridae. In *Veterinary Virology* (3ª edição). California: Elsevier.
- Mylonakis, M., Kalli, I. & Rallis, T.S. (2016). Canine parvoviral enteritis: an update on the clinical diagnosis, treatment, and prevention, *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 7, 31-100.
- Mylonakis, M.E., Siarkou, V.I. & Koutinas, A.F. (2010). Myelosuppressive canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an update on the pathogenesis, diagnosis and management, *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 65(4), 129-135.
- Neer, T.M. (2003). Ehrlichiosis in dogs, *Clinician's Brief*, 28-32. Acedido em 25 de Maio de 2016, disponível em: <http://www.cliniciansbrief.com/sites/default/files/sites/cliniciansbrief.com/files/EhrlichiosisinDogs.pdf>
- Nibblett, B.M.D. & Carr, A.P. (2007). Is it immune-mediated neutropenia?, *Veterinary Medicine*. Acedido em 21 de Maio de 2016, disponível em: <http://veterinarymedicine.dvm360.com/it-immune-mediated-neutropenia?id=&pageID=1&sk=&date=>
- Obradovich, J.E., Ogilvie, G.K., Powers, B.E. & Boone, T. (1991). Evaluation of recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor as an inducer of granulopoiesis: a pilot study, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 5, 75-79.
- Obradovich, J.E., Ogilvie, G.K., Stadler-Morris, S., Schmidt, B.R., Cooper, M.F. & Boone, T.C. (1993). Effect of recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor on peripheral blood neutrophil counts in normal cats, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7, 65-67.

- Ogilvie, G.K., Obradovich, J.E., Cooper, M.F., Walters, L.M., Salman, M.D. & Boone, T.C. (1992). Use of recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor to decrease myelosuppression associated with the administration of mitoxantrone in the dog, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 6, 44-47.
- Pentengell, R., Gurney, H., Radford, J.A., Deakin, D.P., James, R., Wilkinson, P.M., Kane, K., Bentley, J. & Crowther, D. (1992). Granulocyte colony-stimulating factor to prevent dose-limiting neutropenia in non-Hodgkin's lymphoma: a randomized controlled trial, *Blood*, 80(6), 1430-1436.
- Phillips, K., Arai, M., Tanabe, T., Raskin, R., Volz, M., Uhl, E.W. & Yamamoto, J.K. (2005). FIV-infected cats respond to short-term rHuG-CSF treatment which results in anti-G-CSF neutralizing antibody production that inactivates drug activity, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108, 357-371.
- Plumb, D.C. (2015). *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. (8ª edição). Iowa: Wiley-Blackwell.
- Pratt, H.L., Carroll, R.C., McClendon, S., Smathers, E.C., Souza, L.M. & Lothrop, C.D. Jr (1990). Effects of recombinant granulocyte colony-stimulating factor treatment on hematopoietic cycles and cellular defects associated with canine cyclic hematopoiesis [abstract], *Experimental Hematology*, 18(11), 1199-1203.
- Ramsey, I. (Ed.) (2014). *BSAVA Small Animal Formulary*. (8ª edição). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Randels, A. (2013). SIRS. In *Proceedings of International Veterinary Emergency and Critical Care Symposium*. Acedido através do VIN (<http://www.vin.com>) em 6 de Junho de 2016.
- Reagan, W.J. (1993). A review of myelofibrosis in dogs, *Toxicologic Pathology*, 21(2), 164-169.
- Rewerts, J.M., McCaw, D.L., Cohn, L.A., Wagner-Mann, C. & Harrington, D. (1998). Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor for treatment of puppies with neutropenia secondary to canine parvovirus infection [abstract], *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 213(7), 991-992.
- Rothrock, K. (2014). Cyclic hematopoiesis. In VIN – Associate Database. Acedido através do VIN (<http://www.vin.com>) em 25 de Maio de 2016.
- Rudloff, E. (2013). Bone marrow sampling, *Clinician's Brief*, 21-25. Acedido em 10 de Abril de 2016, disponível em: <http://www.cliniciansbrief.com/sites/default/files/attachments/Bone%20Marrow%20Sampling.pdf>
- Schuening, F.G., Storb, R., Goehle, S., Graham, T.C., Appelbaum, F.A., Hackman, R. & Souza, L.M. (1989). Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoiesis of normal dogs and on hematopoietic recovery after otherwise lethal total body irradiation, *Blood*, 74(4), 1308-1313.
- Seixas, R., Alho, A.M., Guerra, D. & Madeira de Carvalho, L. (2011). Doenças caninas de transmissão vectorial: uma picada com muitas consequências!, *Veterinary Medicine*, 18-36.
- Sellon, R.K. & Hartmann, K. (2012). Feline immunodeficiency virus infection. In C.E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4ª edição). (pp. 136-149). Missouri: Saunders Elsevier.

- Shah, J. & Welsh, S.J. (2014). The clinical use of granulocyte-colony stimulating factor, *British Journal of Hospital Medicine*, 75(2), 29-32.
- Smith, T.J., Bohlke, K., Lyman, G.H., Carson, K.R., Crawford, J., Cross, S.J., Goldberg, J.M., Khatcheressian, J.L., Leighl, N.B., Perkins, C.L., Somlo, G., Wade, J.L., Wozniak, A.J. & Armitage, J.O. (2015). Recommendations for the use of WBC growth factors: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update, *Journal of Clinical Oncology*, 33, 1-14.
- Sontas, H.B., Dokuzeylu, B., Turna, O. & Ekici, H. (2009). Estrogen-induced myelotoxicity in dogs: a review, *The Canadian Veterinary Journal*, 50, 1054-1058.
- Sorenmo, K.U., Harwood, L.P., King L.G. & Drobatz, K.J. (2010). Case-control study to evaluate risk factors for the development of sepsis (neutropenia and fever) in dogs receiving chemotherapy, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236, 650-656.
- Sourgens, H. & Lefrère, F. (2011). A systematic review of available clinical evidence – Filgrastim compared with Lenograstim, *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 49(8), 510-518.
- Suttorp, M., Hoffmann, B. & Sippell, W.G. (2002). Prevention of oestradiol-associated toxicosis in a dalmatian by early intervention with granulocyte colony-stimulating factor, *The Veterinary Record*, 151, 244-245.
- Tamai, H., Mukuta, T., Matsubayashi, S., Fukuta, S., Komaki, G., Kuma, K., Kumagai, L.F. & Nagataki, S. (1993). Treatment of methimazole-induced agranulocytosis using recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF), *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 77, 1356-1360.
- Taylor, S.S., Goodfellow, M.R., Browne, W.J., Walding, B., Murphy, S., Tzannes, S., Gerou-Ferriani, M., Schwartz, A. & Dobson, J. (2009). Feline extranodal lymphoma: response to chemotherapy and survival in 110 cats, *Journal of Small Animal Practice*, 50, 584-592
- Thrall, M.A. (2012). Lymphoproliferative disorders and myeloid neoplasms. In M.A. Thrall, G. Weiser, R.W. Allison & T.W. Campbell (Eds.), *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. (2ª edição). (pp. 166-184). Iowa: Wiley-Blackwell.
- Tolar, J., Teitelbaum, S.L. & Orchard, P.J. (2004). Osteopetrosis, *The New England Journal of Medicine*, 351, 2839-2349.
- Trepanier, L.A. (2013). Idiosyncratic drug toxicities. In *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings*. Acedido através do VIN (<http://www.vin.com>) em 20 de Maio de 2016.
- Trillet-Lenoir, V., Green, J., Manegold, C., Von Pawel, J., Gatzemeier, U., Lebeau, B., Depierre, A., Johnson, P., Decoster, G., Tomita, D. & Ewen, C. (1993). Recombinant granulocyte colony-stimulating factor reduces the infectious complications of cytotoxic chemotherapy, *European Journal of Cancer*, 29(3), 319-324.
- Truyen, U., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E. & Horzinek, M.C. (2009). Feline panleukopenia: ABCD guidelines on prevention and management, *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, 538-546.

- Tvedten, H. & Raskin R.E. (2012). Leukocyte disorders. In M.D. Willard & H. Tvedten, *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. (5ª edição). (pp. 63-91). Missouri: Saunders Elsevier.
- Vargo, C.L., Taylor, S.M. & Haines, D.M. (2007). Immune mediated neutropenia and thrombocytopenia in 3 giant schnauzers, *The Canadian Veterinary Journal*, 48, 1159-1163.
- Waugh, C.E., Scott, K.D. & Bryan, L.K. (2014). Primary immune-mediated neutropenia in a cat, *The Canadian Veterinary Journal*, 55, 1074-1078.
- Weiser, G. (2012). Neutrophil production, trafficking and kinetics. In M.A. Thrall, G. Weiser, R.W. Allison & T.W. Campbell (Eds.), *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. (2ª edição). (pp. 123-126). Iowa: Wiley- Blackwell.
- Weiss, D.J. (2005). Bone marrow necrosis in dogs: 34 cases (1996-2004), *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(2), 263-267.
- Weiss, D.J. (2012). Drug-associated blood cell dyscrasias, *Compendium: Continuing Education for Veterinarians*, 34(6), E1-8.
- Weiss, D.J. & Smith, S.A. (2002). A retrospective study of 19 cases of canine myelofibrosis, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16, 174-178.
- Weiss, D.J. & Tvedten, H. (2012). The complete blood count, bone marrow examination and blood banking. In M.D. Willard & H. Tvedten, *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. (5ª edição). (pp. 41-45). Missouri: Saunders Elsevier.
- Welte, K., Gabilove, J., Bronchud, M.H., Platzer, E. & Morstyn, G. (1996). Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years, *Blood*, 88(6), 1907-1929.
- Withrow, S.J., Vail, D.M. & Page, R.L. (2013). *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (5ª edição). (pp. xv). Missouri: Saunders Elsevier.
- Yamamoto, A., Fujino, M., Tsuchiya T. & Iwata, A. (2011). Recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor accelerates recovery from cyclophosphamide-induced neutropenia in dogs, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 142, 271-275.
- Yamamoto, A., Iwata, A., Saitoh, T., Tsuchiya, K., Kanai, T., Tsujimoto, H., Hasegawa, A., Ishihama, A. & Ueda, S. (2002). Expression in *Escherichia coli* and purification of the functional feline granulocyte colony-stimulating factor, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 90, 169-177.
- Zinzani, P.L., Pavone, E., Stori, S., Moretti, L., Fattori, P.P., Guardigni, L., Falini, B., Gobbi, M., Gentilini, P., Lauta, V.M., Bendandi, M., Gherlinzoni, F., Magagnoli, M., Venturi, S., Aitini, E., Tabanelli, M., Leone, G., Liso, V. & Tura, S. (1994). Randomized multicenter trial with or without granulocyte colony-stimulating factor as adjunct to induction VNCOP treatment of elderly high-grade non-Hodgkin's lymphoma, *Blood*, 89(11), 3974-3979.

Anexo 1 – Intervalos de referência do hemograma (VetScan HM5, Abaxis®)

Parâmetro	Unidades	Cão	Gato
Leucograma			
Leucócitos totais	x 10 ³ /μl	6,0 – 17,0	5,5 – 19,5
Neutrófilos	x 10 ³ /μl	3,0 – 12,0	2,5 – 14,0
Linfócitos	x 10 ³ /μl	1,0 – 4,8	1,5 – 7,0
Monócitos	x 10 ³ /μl	0,2 – 1,5	0,0 – 1,5
Eosinófilos	x 10 ³ /μl	0,0 – 0,8	0,0 – 1,0
Basófilos	x 10 ³ /μl	0,0 – 0,4	0,0 – 0,2
Eritrograma			
Eritrócitos	x 10 ⁶ /μl	5,5 – 8,5	5,0 – 10,0
Hemoglobina	g/dl	12,0 – 18,0	8,0 – 15,0
Hematócrito	%	37,0 – 55,0	24,0 – 45,0
VCM	fl	60,0 – 77,0	39,0 – 45,0
HCM	pg	19,5 – 24,5	12,5 – 17,5
CHCM	g/dl	31,0 – 34,0	30,0 – 36,0
Trombograma			
Plaquetas	x 10 ³ /μl	200 – 500	300 – 800
VPM	fl	3,9 – 11,1	12,0 – 17,0