



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA IMUNOSSUPRESSÃO
ASSOCIADA À QUIMIOTERAPIA, EM CÃES

FRANCISCA ORNELAS NOGUEIRA LIMA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São
Braz

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

ORIENTADORA

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira
São Braz

CO-ORIENTADOR

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2011

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA IMUNOSSUPRESSÃO
ASSOCIADA À QUIMIOTERAPIA, EM CÃES

FRANCISCA ORNELAS NOGUEIRA LIMA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São
Braz

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

ORIENTADORA

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira
São Braz

CO-ORIENTADOR

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2011

LISBOA

DEDICATÓRIA

Para a Marga.

AGRADECIMENTOS

Foram muitas as pessoas que me ajudaram e enriqueceram o meu percurso pela FMV. Entre professores, médicos e outros funcionários do Hospital Escolar da FMV, família e amigos, a lista parece nunca mais acabar.

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora, a professora Berta São Braz, pela sua orientação, disponibilidade, toda a ajuda que me deu e a atenção ao pormenor na correcção da minha tese e ao meu co-orientador, o Dr. Gonçalo Vicente, por tudo o que me ensinou, todo o apoio e incentivo e por me ter tornado uma pessoa mais confiante nas minhas capacidades.

Depois quero também agradecer ao Professor António Ferreira por me ter permitido realizar o meu estágio curricular no Hospital Escolar da FMV.

Tenho que fazer um agradecimento muito especial à professora Ana Duarte, que apesar de oficialmente não lhe competir essa função, foi de importância chave na realização deste trabalho, com os seus conhecimentos (teóricos e práticos) e com uma disponibilidade inigualável.

Agradeço ao Centro de Investigação Interdisciplinar e Sanidade Animal (CIISA) por viabilizar a realização desta tese, disponibilizando os meios materiais e financeiros necessários.

Claro que estes anos passados na FMV seriam impensáveis sem a presença de um conjunto de colegas que rapidamente se tornaram amigos sem igual. Não posso assim deixar de agradecer ao “Grupo”, à Susana, à Rita, ao Rui, à Sofia e ao Ricardo e a outros que depois se aproximaram, à Joana M., à Joana G. e à Filipa.

Agradeço aos meus colegas de estágio no Hospital Escolar da FMV que tornaram inesquecível esse período que já deixa muitas saudades. Foram eles o Tiago G., a Catarina, a Geraldine, a Joana M., o Luís, a Lúcia, a Marta, a Fábria, a Inês, a Joana D., a Rafaela, a Diana C., a Diana M. e o Tiago R.

Preciso também de agradecer a grande ajuda da minha colega Sílvia Cruz, a quem ainda estou a dever um bolinho, pois sem ela não teria conseguido obter todas amostras que necessitava.

Todos os médicos que me ajudaram, ensinaram e aturaram durante o estágio e não só, entre eles o Dr. Gonçalo Vicente, a Dra. Marisa Ferreira, a Dra. Joana Pontes, a Dra. Joana Gomes, o Dr. Ricardo Ferreira, o Dr. Ricardo Marques, o Dr. António Almeida, a Dra. Leonor Iglésias, a Dra. Carla Monteiro, a Dra. Alexandra Basso, a Professora Sandra Jesus, a Dra. Ana Murta e Dra. Ivone Costa.

Quero também agradecer aos auxiliares do Hospital Escolar da FMV, Pedro Lourenço, Carla Silva, Luís Silva, Carla Pardal e Sofia Caldeira que tão pacientemente me ajudaram nas inúmeras colheitas de amostras dos cães da quimioterapia.

Tenho também de agradecer às meninas da recepção do Hospital Escolar da FMV, Tânia Sobral, Rita Costa e Ana Bernardino, pela companhia, pela amizade, pelos ensinamentos e por me mostrarem o funcionamento do atendimento ao público.

Agradeço imenso à Clara Cartaxeiro toda a ajuda que me deu no meu trabalho no laboratório de Virologia da FMV.

Tenho também de agradecer a todas as pessoas do laboratório de Virologia do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV) que me ajudaram durante a minha curta estadia, são elas a Doutora Margarida Duarte, o Doutor Miguel Fevereiro e a Sra. Fátima Cordeiro.

Agradeço também ao aluno Pedro Castanheira sem ajuda do qual não teria obtido os meus últimos resultados.

Como os animais que integraram este estudo não compreendem uma mensagem de agradecimento resta-me agradecer aos seus proprietários por toda a sua simpatia e colaboração.

Não posso deixar de agradecer à minha mãe e à minha irmã e ao meu pai por todo o apoio e por acreditarem em mim.

Não posso deixar de agradecer ao Gonçalo cujo apoio foi essencial para me ajudar a andar para a frente e cumprir os meus objectivos.

Por fim tenho também de agradecer à Professora Ana Rita Gaio do Departamento de Matemática da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto por toda a ajuda.

RESUMO

Título: Contribuição para o estudo da imunossupressão associada à quimioterapia, em cães

Resumo: Com a melhoria dos cuidados médicos prestados aos animais de companhia, assistimos nos últimos anos a um aumento da esperança média de vida e a uma melhoria da qualidade da mesma. Paralelamente é evidente um aumento significativo da incidência de doenças neoplásicas nestes animais, conduzindo à utilização cada vez mais frequente de protocolos terapêuticos com fármacos antineoplásicos/quimioterapia, que se apresentam como uma das opções no tratamento dessas mesmas doenças.

De modo a conjugar efeito curativo máximo com o máximo de bem-estar animal torna-se necessário conhecer os possíveis efeitos secundários que podem surgir na sequência do tratamento com fármacos citotóxicos, nomeadamente os efeitos adversos que ocorrem ao nível do sistema imunitário

O objectivo deste trabalho foi avaliar se a administração de fármacos citotóxicos, em canídeos com diferentes tipos de neoplasias, pode ser causa de interferência no sistema imunitário destes animais, ou seja provocando imunossupressão.

Numa amostra de nove canídeos, com diferentes tipos de neoplasias, submetidos a quimioterapia pela primeira vez, foram avaliados vários parâmetros, antes do início do tratamento e após duas sessões de tratamento. Esses parâmetros foram, a presença do PVC no sangue e nas fezes, hemograma, títulos de anticorpos para o PVC e sinais clínicos apresentados.

O facto de a amostra, inquirida neste estudo, ser de reduzidas dimensões não permitiu que os objectivos propostos fossem atingidos na sua totalidade. Mas eles devem suscitar a necessidade proceder a estudos mais aprofundados nesta área de grande importância para a Medicina Veterinária.

Palavras-chave: quimioterapia, canídeos, imunossupressão, PVC

ABSTRACT

Title: Contribution to the study of chemotherapy associated immunosuppression in dogs

Abstract: With increasingly better medical care to companion animals, we have seen, in the last few years, an increment of their average life expectancy and life quality. At the same time it is clear a significant increase in the incidence of neoplastic disease in these animals, leading to more frequent use of therapeutic protocols with antineoplastic agents / chemotherapy, which are presented as an option in the treatment of those diseases.

In order to combine maximum healing effect with maximum animal welfare it is necessary to know the possible side effects that may occur following treatment with cytotoxic drugs, including adverse effects that take place at the immune system.

The aim of this study was to evaluate whether the administration of cytotoxic drugs in dogs with different types of cancer, can interfere with the immune system of these animals, causing immunosuppression.

In a group of nine dogs with different types of cancer, undergoing chemotherapy for the first time, several parameters were evaluated before starting treatment and after two treatment sessions. These parameters were the presence of CPV in the blood and feces, complete blood count, antibody titers for CPV and exhibited clinical signs.

As the sample surveyed in this study was very small, not all the proposed goals were achieved in full. But they should raise the need to undertake further studies in this area of great importance for Veterinary Medicine.

Keywords: chemotherapy, dogs, immunosuppression, CPV

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
II. CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA IMUNOSSUPRESSÃO ASSOCIADA À QUIMIOTERAPIA, EM CÃES	3
1. Quimioterapia.....	3
1.1. Generalidades	3
1.2. Grupos de fármacos citotóxicos.....	5
1.2.1. Agentes alquilantes.....	5
1.2.1.1. Mostardas de azoto	5
1.2.1.2. Nitrosoureas	6
1.2.1.3. Outros agentes alquilantes	7
1.2.2. Compostos platinados.....	7
1.2.3. Antimetabolitos.....	8
1.2.3.1. Análogos do ácido fólico.....	8
1.2.3.2. Análogos das pirimidinas.....	9
1.2.4. Produtos naturais	10
1.2.4.1. Alcalóides da vinca.....	10
1.2.4.2. Taxanos.....	10
1.2.4.3. Epipodofilotoxinas	11
1.2.4.4. Camptotecinas.....	11
1.2.4.5. Antibióticos - Inibidores das topoisomerases	11
1.2.4.6. Antraciclina	11
1.2.4.7. Antracenedionas.....	13
1.2.4.8. Enzimas.....	13
1.2.5. Hormonas e antagonistas	13
1.2.5.1. Corticosteróides.....	14
1.2.6. Outros citotóxicos.....	14
1.2.6.1. Hidroxiureia	14
1.2.6.2. Inibidores das ciclooxigenases	14
1.2.7. Novas abordagens e fármacos em estudo	15
1.2.7.1. Inibidores do proteossoma.....	15
1.2.7.2. Receptores dos factores de crescimento epidérmico.....	15
1.3. Protocolos de fármacos citotóxicos utilizados em quimioterapia no Hospital Escolar da FMV no tratamento de neoplasias em canídeos no primeiro semestre de 2011	16
1.4. Parvovirus canino	19
1.4.1. Etiologia	19

1.4.2.	Epidemiologia.....	19
1.4.3.	Patogénese.....	20
1.4.4.	Diagnóstico.....	21
1.4.5.	Imunidade após a infecção.....	22
1.4.6.	Estabelecimento e duração da imunização.....	22
1.5.	Imunidade.....	24
1.5.1.	Imunidade inespecífica.....	24
1.5.2.	Imunidade específica.....	26
1.5.2.1.	Resposta imunitária mediada por anticorpos.....	27
1.5.2.2.	Resposta imunitária mediada por células.....	27
1.5.3.	Resposta imunitária a infecções virais.....	29
1.5.4.	Imunossupressão e quimioterapia.....	31
III.	TRABALHO EXPERIMENTAL.....	41
1.	Introdução.....	41
2.	Material e Métodos.....	42
2.1.	Animais.....	42
2.2.	Amostras de trabalho.....	43
2.3.	Análise estatística.....	46
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
1.	Detecção do PVC.....	49
2.	Detecção do Coronavírus.....	52
3.	Hemograma.....	53
4.	Sinais clínicos.....	56
5.	Avaliação dos títulos de anticorpos.....	57
6.	Considerações finais.....	61
V.	CONCLUSÃO.....	67
VI.	BIBLIOGRAFIA.....	69
VII.	ANEXOS.....	77
1 -	História clínica.....	77
2 -	Valores de referência das analíticas sanguíneas e quantificação de ADN.....	81
3 -	Títulos de anticorpos e detecção de PVC (animais doentes e animais saudáveis).....	85
4 -	Resultados dos hemogramas dos animais de quimioterapia no dia da primeira e terceira sessões.....	89
5 -	Análise estatística GraphPad InStat.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo celular (adaptado de Barton, 2001).....	4
Figura 2, 3, 4 e 5 - Visualização no aparelho <i>Image Master® VDS – Pharmacia Biotech</i> do resultado da electroforese em gel de agarose dos produtos obtidos por PCR das amostras dos canídeos submetidos a quimioterapia..	49
Figura 3 - Visualização no aparelho <i>Image Master® VDS – Pharmacia Biotech</i> do resultado da electroforese em gel de agarose dos produtos obtidos por PCR das amostras dos canídeos submetidos a quimioterapia.....	50
Figura 4 - Visualização no aparelho <i>Image Master® VDS – Pharmacia Biotech</i> do resultado da electroforese em gel de agarose dos produtos obtidos por PCR das amostras dos canídeos submetidos a quimioterapia.....	50
Figura 5 - Visualização no aparelho <i>Image Master® VDS – Pharmacia Biotech</i> do resultado da electroforese em gel de agarose dos produtos obtidos por PCR das amostras dos canídeos submetidos a quimioterapia.....	51
Figura 6 - Visualização no aparelho <i>Image Master® VDS – Pharmacia Biotech</i> do resultado da electroforese em gel de agarose do grupo de cães saudáveis.....	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos indivíduos doentes.....	42
Tabela 2 – Características dos indivíduos saudáveis.....	43
Tabela 3 – Resumo dos resultados da detecção de PVC nas amostras de plasma, células sanguíneas e fezes dos animais submetidos a quimioterapia.....	51
Tabela 4 – Resultados dos hemogramas na primeira sessão de quimioterapia (antes de iniciar o tratamento).	53
Tabela 5 - Resultados dos hemogramas na terceira sessão de quimioterapia (excepto animal Nº 1, quarta sessão).....	53
Tabela 6 – Resultados obtidos utilizando o <i>Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test</i> na avaliação estatística dos hemogramas dos animais submetidos a quimioterapia.....	54
Tabela 7 – Sinais clínicos apresentados pelos cães, na primeira (antes do início do tratamento) e na terceira sessão de quimioterapia.....	56
Tabela 8 - Título de anticorpos para o PVC nos canídeos doentes na primeira e na terceira sessão de quimioterapia.	57
Tabela 9 – Título de anticorpos para o PVC e detecção do vírus no plasma dos canídeos saudáveis.....	58
Tabela 10 – Resultados da avaliação estatística utilizando o <i>Mann-Whitney Test</i> da relação entre os títulos de anticorpos para o PVC da população de animais submetidos a quimioterapia antes de iniciarem o tratamento (1ª sessão) e os títulos de anticorpos da população de animais saudáveis do grupo controlo.....	59
Tabela 11 - Resultados da avaliação estatística utilizando o <i>Mann-Whitney Test</i> da relação entre os títulos de anticorpos para o PVC da população de animais submetidos a quimioterapia depois de duas sessões de tratamento (3ª sessão) e os títulos de anticorpos da população de animais saudáveis do grupo controlo.....	60
Tabela 12 - Resultados da avaliação estatística utilizando o <i>Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test</i> da relação entre os títulos de anticorpos para o PVC da população de animais submetidos a quimioterapia antes de iniciarem o tratamento (1ª sessão) e os títulos de anticorpos da população de animais submetidos a quimioterapia após duas sessões de tratamento (3ª sessão).....	60
Tabela 13 - Valores de referência das analíticas sanguíneas (Feldman, Zinkl & Jain, 2000).	81
Tabela 14 - Quantificação de ADN (animais 1 a 9) e ARN (animais 1 a 7) por espectrofotometria nas amostras de plasma, células sanguíneas e zaragatoas rectais (total de 6 amostras por animal).	81

Tabela 15 - Quantificação de ADN por espectrofometria nas amostras de plasma dos 4 animais saudáveis.	83
Tabela 16 – Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do <i>kit</i> de <i>ELISA</i> para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de sangue (células e plasma) e fezes da primeira e quarta sessão de quimioterapia do canídeo N° 1 (Mia).	85
Tabela 17 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do <i>kit</i> de <i>ELISA</i> para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de sangue (células e plasma) e fezes da primeira e terceira sessão de quimioterapia do canídeo N° 2 (Sting).....	85
Tabela 18 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do <i>kit</i> de <i>ELISA</i> para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de sangue (células e plasma) e fezes da primeira e terceira sessão de quimioterapia do canídeo N° 3 (Guga).	85
Tabela 19 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do <i>kit</i> de <i>ELISA</i> para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de sangue (células e plasma) e fezes da primeira e terceira sessão de quimioterapia do canídeo N° 4 (Tignes).	85
Tabela 20 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do <i>kit</i> de <i>ELISA</i> para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de sangue (células e plasma) e fezes da primeira e terceira sessão de quimioterapia do canídeo N° 5 (Sushi).	86
Tabela 21 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do <i>kit</i> de <i>ELISA</i> para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de sangue (células e plasma) e fezes da primeira e terceira sessão de quimioterapia do canídeo N° 6 (Zeus).	86
Tabela 22 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do <i>kit</i> de <i>ELISA</i> para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de sangue (células e plasma) e fezes da primeira e terceira sessão de quimioterapia do canídeo N° 7 (Jox).	86
Tabela 23 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do <i>kit</i> de <i>ELISA</i> para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de sangue (células e plasma) e fezes da primeira e terceira sessão de quimioterapia do canídeo N° 8 (Boogie).	87
Tabela 24 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do <i>kit</i> de <i>ELISA</i> para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de	

sangue (células e plasma) e fezes da primeira e terceira sessão de quimioterapia do canídeo N° 9 (Tobias).	87
Tabela 25 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do <i>kit</i> de <i>ELISA</i> para diferentes diluições da amostra e resultados da pesquisa de ADN viral na amostra de plasma do canídeo saudável A (Canza).....	87
Tabela 26 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do <i>kit</i> de <i>ELISA</i> para diferentes diluições da amostra e resultados da pesquisa de ADN viral na amostra de plasma do canídeo saudável B (Golias).....	88
Tabela 27 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do <i>kit</i> de <i>ELISA</i> para diferentes diluições da amostra e resultados da pesquisa de ADN viral na amostra de plasma do canídeo saudável C (Rabeca).	88
Tabela 28 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do <i>kit</i> de <i>ELISA</i> para diferentes diluições da amostra e resultados da pesquisa de ADN viral na amostra de plasma do canídeo saudável D (Estrela).....	88
Tabela 29 – Hemogramas da primeira e quarta sessão de quimioterapia do animal N° 1 (Mia).	89
Tabela 30 - Hemogramas da primeira e terceira sessão de quimioterapia do animal N° 2 (Sting).	89
Tabela 31 - Hemogramas da primeira e terceira sessão de quimioterapia do animal N° 3 (Guga).	89
Tabela 32 - Hemogramas da primeira e terceira sessão de quimioterapia do animal N° 4 (Tignes).	89
Tabela 33 - Hemogramas da primeira e terceira sessão de quimioterapia do animal N° 5 (Sushi).	90
Tabela 34 - Hemogramas da primeira e terceira sessão de quimioterapia do animal N° 6 (Zeus).	90
Tabela 35 - Hemogramas da primeira e terceira sessão de quimioterapia do animal N° 7 (Jox).....	90
Tabela 36 - Hemogramas da primeira e terceira sessão de quimioterapia do animal N° 8 (Boogie).	90
Tabela 37 - Hemogramas da primeira e terceira sessão de quimioterapia do animal N° 9 (Tobias).	90

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Títulos de anticorpos para o PVC na primeira e terceira sessão de quimioterapia, detecção de ADN de PVC e intervalo de tempo entre as duas sessões de quimioterapia. ..61

ABREVIATURAS

ADN Ácido desoxirribonucleico

ARN Ácido ribonucleico

ARNm Ácido ribonucleico mensageiro

BID De 12 em 12h (*bis in die*)

BOPP Carmustina, vincristina, procarbazona e prednisona

BP Pares de bases

°C Graus Celcius

CD *Cluster of differentiation molecules*

COX-2 Cicloxigenase-2

CHOP Ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona

CDV *Canine distemper vírus*

CM Centímetros

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA *Enzyme linked immunossorbent assay*

EV Via endovenosa

FCoV Coronavírus felino

G Aceleração da gravidade

HI Prova de inibição da hemaglutinação

HT Hematócrito

H₀ Hipótese nula

ICOX-2 Inibidores da cicloxigenase-2

IFN-γ Interferão gama

IgA Imunoglobulina A

IgD Imunoglobulina D

IgE Imunoglobulina E

IgG Imunoglobulina G

IgM Imunoglobulina M

IL Interleucina

IL-2 Interleucina 2

IM Via intramuscular

KG Quilograma

LNIV Laboratório Nacional de Investigação Veterinária

MOPP Mecloretamina, vincristina, procarbazona e prednisona

MG Miligrama

MHC Complexo maior de histocompatibilidade

MHC-I Complexo maior de histocompatibilidade classe 1
MHC-II Complexo maior de histocompatibilidade classe 2
MVC *Minute virus of canines*
 μ l Microlitros
 μ M Micromoles
M² Metros quadrados
Ng Nanogramas
NK Células *Natural killer*
NM Nanómetros
P Valor de p
PAAF Punção aspirativa por agulha fina
PBMC Células mononucleadas do sangue periférico
PBS *Phosphate buffered saline*
PCR *Polymerase chain reaction*
PVC Parvovírus canino
RT-PCR *Real-time polymerase chain reaction*
SID De 24 em 24h (*semel in die*)
SNC Sistema nervoso central
TAC Tomografia Axial Computorizada
TCR Receptores dos linfócitos T
TNF- α Factor de necrose tumoral alfa
TNF- β Factor de necrose tumoral beta
TVT Tumor venéreo transmissível
V *Volts*
VN Prova de neutralização viral

I. INTRODUÇÃO

O estágio curricular da aluna foi realizado no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, por um período de 6 meses (de dia 15 de Setembro 2010 a dia 15 de Março de 2011), na área de clínica de animais de companhia.

Durante o estágio a aluna frequentou os diferentes serviços do Hospital Escolar, nomeadamente Imagiologia, Medicina Interna, Cirurgia e Internamento, em turnos rotativos de oito horas e em turnos de doze ou vinte e quatro horas no caso do Internamento.

Na área de Imagiologia, que incluiu Radiologia, Mielografia, Tomografia Axial Computorizada (TAC), Ecografia (abdominal e ecocardiografia), teve oportunidade de auxiliar nos procedimentos de posicionamento e contenção do animal, anestesia (colocação de cateter, intubação endotraqueal e monitorização anestésica) e recuperação da anestesia, realização e interpretação dos exames.

No campo da Medicina Interna a aluna pôde assistir a consultas, auxiliar na realização da anamnese, do exame físico, do plano de diagnóstico e da terapêutica a instituir. Teve também a oportunidade de executar, ou auxiliar a execução, de vários procedimentos tais como: colheita de sangue para análises sanguíneas, dádivas de sangue para posterior transfusão, tipificação sanguínea, colocação de cateter para adaptação de sistemas de venóclise, medição da glicémia, drenagem de líquido abdominal, raspagem de pele, colheita de pêlos, citologia por aposição e citologia por fita-cola, observação e limpeza do conduto auditivo e zaragatoa auricular, teste de fluoresceína e teste de *Schirmer*, pensos simples, pensos gordos e pensos estabilização ortopédica (*Robert-Jones*, e pensos com tala), limpeza de feridas, retirar pontos simples, administração de medicamentos (via oral, endovenosa, intramuscular e subcutânea), electrocardiogramas, medição pressão arterial e teste lâmpada de *Wood*. Como o tema da tese de mestrado versa a área de Oncologia, a aluna participou em consultas da área e nas sessões de quimioterapia que incluíam a recepção dos animais, pesagem, colocação de cateteres, colheita de sangue para análises sanguíneas, administração dos fármacos e esclarecimento de dúvidas dos proprietários sobre cuidados especiais a ter com os animais tratados. Assistiu também a consultas de outras áreas tais como Ortopedia, Oftalmologia, Dermatologia, Neurologia.

No período em que frequentou o serviço de cirurgia, acompanhou os animais antes, durante e após a cirurgia. Teve oportunidade de participar na preparação do animal para cirurgia e de realizar a monitorização anestésica e a extubação do animal, efectuar pensos simples e pensos de estabilização ortopédica (*Robert-Jones* e pensos com tala) e também remover suturas de pele. Pôde ainda ser ajudante de cirurgião em diferentes tipos de cirurgias, realizar orquiectomias de gatos e vários tipos de suturas. Pôde assistir a outras cirurgias tais como: ovariectomias, electivas e piómetras (cadelas e gatas), orquiectomias,

electivas (cães e gatos), ou relacionadas com doença prostática no caso dos cães, destartarizações e extracções de dentes, mastectomias devido a neoplasias mamárias (cadelas e gatas), resolução de fracturas, enterectomias devido à presença de corpo estranho, resolução de torção de estômago e baço, extracção de baço, resolução de hérnia diafragmática, resolução de hérnia perineal e sutura de pequenas lacerações.

No serviço de Internamento de cães e gatos a estagiária prestou cuidados relacionados com a higiene e bem-estar dos animais que incluíam alimentação, limpeza das jaulas e passeio dos cães no exterior do hospital. Realizou a monitorização dos sinais vitais dos animais internados, administrou os medicamentos prescritos e quando necessário realizou vários tipos de procedimentos médicos como algaliação, colocação de cateteres, colheitas de sangue para análises sanguíneas, pensos simples, limpeza e desinfecção de feridas, entre outros.

Para a aluna o período de estágio realizado no Hospital Escolar da FMV foi de importância chave na sua formação, tanto a nível científico como a nível técnico e pessoal.

Quanto à escolha do tema da dissertação, “Contribuição para o estudo da imunossupressão associada à quimioterapia, em cães”, foram tidos em conta diversos factores nomeadamente: o interesse da aluna pela área da Oncologia Veterinária; ser cada vez mais comum a realização de quimioterapia em animais de companhia na prática clínica e de não serem ainda bem conhecidas as suas consequências para o sistema imunitário do animal; a existência no Hospital Escolar da FMV da especialidade de Oncologia e a possibilidade da realização de quimioterapia como forma de tratamento dos animais com doenças neoplásicas; a casuística elevada do Hospital Escolar também foi um factor importante pois permitiria obter uma amostra de animais mais significativa e a existência de um pequeno número de estudos publicados sobre o tema em Medicina Veterinária comparado com a grande quantidade existente em Medicina Humana.

II. CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA IMUNOSSUPRESSÃO ASSOCIADA À QUIMIOTERAPIA, EM CÃES

1. Quimioterapia

Em Medicina Veterinária, a quimioterapia tem vindo a ser cada vez mais utilizada no tratamento de tumores em animais de companhia, permitindo assim um prolongamento da esperança média de vida e uma melhoria da qualidade de vida destes pacientes.

1.1. Generalidades

Antes de ser instituído qualquer tipo de tratamento, em relação ao doente oncológico é necessário ter em conta uma série de factores cruciais, que segundo Coppoc (2009) são:

- Doente – espécie, raça, idade, sexo, estado de saúde, função;
- Neoplasia – tipo histológico, evolução, estadio, grau de malignidade, localização;
- Instalações/tratamentos disponíveis – hipóteses de tratamento (cirurgia, radioterapia e quimioterapia), acompanhamento médico, proximidade;
- Proprietário – capacidade de cuidar do animal, relação com o animal, condições de vida, compromisso e estatuto financeiro.

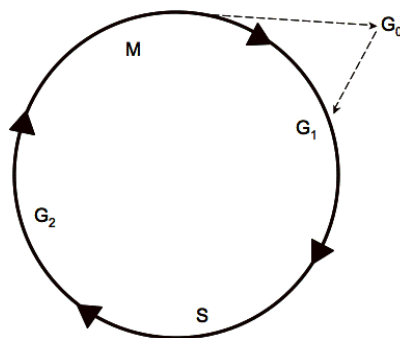
De acordo com o mesmo autor a quimioterapia pode ser definida como a administração de fármacos com vista à eliminação ou inibição do crescimento de vírus ou células estranhas, como bactérias, no organismo. As células neoplásicas, neste sentido podem ser consideradas estranhas.

Segundo outro autor (Barton, 2001) o objectivo da quimioterapia é eliminar ou suprimir o crescimento de células malignas sem eliminar as células ditas “normais” do organismo. No entanto a maioria dos fármacos usados, de acordo com a dose administrada, podem eliminar ambos os tipos de células. Para que um fármaco antineoplásico seja útil tem de possuir toxicidade selectiva, ou seja, ser mais tóxico para células neoplásicas do que para as células normais em doses convencionais.

A quimioterapia está indicada em situações como o tratamento primário de tumores localizados ou sistémicos com objectivo curativo, como no caso do tumor venéreo transmissível, ou paliativo, como no caso das neoplasias hematopoiéticas; o tratamento adjuvante, normalmente com interesse paliativo, que inclui a acção directa sobre células metastáticas microscópicas após remoção do tumor primário; o tratamento neo-adjuvante, cujo objectivo é reduzir a dimensão do tumor primário de modo a melhorar as hipóteses da sua eliminação por outros meios, tais como a cirurgia. Esta aplicação tem a vantagem de permitir ao clínico avaliar a sensibilidade do tumor aos quimioterápicos. No entanto, se o tumor não responder, será uma desvantagem séria desta aplicação uma vez que há um atraso do início de um tratamento efectivo (Hohenhaus, Peaston & Maddison, 2002).

São conhecidos muitos fármacos diferentes com acção antineoplásica. (...) A sua acção depende da interacção com importantes substratos ou enzimas relacionadas com a síntese ou função do ADN. Por esta razão, a maioria dos fármacos antineoplásicos são ineficazes contra células que não se encontram em divisão celular, pelo que os tumores com índice mitótico mais elevado têm maior probabilidade de ser sensíveis à quimioterapia do que os de baixo índice mitótico. Como os fármacos antineoplásicos actuam de forma mais eficaz sobre células em divisão activa é importante perceber as diferentes fases do ciclo celular (Figura 1) antes de seleccionar o fármaco mais indicado (Barton, 2001,p.330, tradução livre).

Figura 1 - Ciclo celular (adaptado de Barton, 2001)



Legenda: M – fase mitótica; G₀ – fase de repouso; G₁ – fase intermitótica; S – fase de síntese de ADN; G₂ – fase pré-mitótica.

Tanto as células neoplásicas como as não neoplásicas sofrem os mesmos processos bioquímicos, mas a velocidade e a altura em que estes se dão é diferente. Na maioria dos tumores, o sucesso da quimioterapia depende da utilização de fármacos que sejam absorvidos rapidamente, se liguem mais eficientemente a um constituinte da célula tumoral, ou afectem processos que ocorrem mais rapidamente na célula tumoral, reforçando assim o seu efeito em células neoplásicas relativamente a células normais (Coppoc, 2009).

De acordo com a sua dependência ou não do ciclo celular os agentes quimioterápicos podem ser divididos em três categorias: independentes do ciclo celular, apesar de tóxicos para todo o tipo de células são especialmente tóxicos para células em divisão (ex.: agentes alquilantes); dependentes do ciclo celular, as células têm de se encontrar em divisão para que estes fármacos sejam eficazes e dependentes da fase do ciclo celular, fármacos apenas activos numa das fases do ciclo celular (Gaffney, 2004).

Os agentes citotóxicos podem ser utilizados em protocolos de fármaco único ou em protocolos de associação de fármacos.

No caso dos protocolos de fármaco único as vantagens são os custos menores, a toxicidade menor e menos tempo despendido na clínica/hospital veterinário. As desvantagens são a

menor eficácia e menor controlo do desenvolvimento do tumor, possivelmente devido à proliferação de células resistentes ao fármaco em utilização.

No caso dos protocolos de associação de fármacos as vantagens são a maior eficácia e desenvolvimento mais lento de resistência aos citotóxicos, já as desvantagens são os custos mais elevados, o aumento do risco de toxicidade, e a dispensa de mais tempo na clínica/hospital veterinário. Neste tipo de protocolos cada fármaco deve ter de forma isolada algum grau de eficácia contra a neoplasia alvo; a conjugação de toxicidade deve ser evitada ou a administração dos fármacos deve ser programada de modo a compensá-la; a dose máxima deve ser utilizada sempre que possível e devem ser combinados fármacos com diferentes mecanismos de acção contra as células neoplásicas de modos a maximizar o número de células eliminadas (Lana, 2003).

1.2. Grupos de fármacos citotóxicos

Os fármacos citotóxicos podem ser então divididos em diferentes grupos, principalmente no que se refere ao seu mecanismo de acção.

1.2.1. Agentes alquilantes

Os fármacos alquilantes têm um mecanismo de acção independente do ciclo celular, pois tanto são letais para células em repouso como para células em divisão, apesar destas últimas serem mais sensíveis. Assim, estes fármacos são eficazes não só contra tumores de crescimento lento como contra tumores de crescimento rápido (Hohenhaus, Peaston & Maddison, 2002). São muito mais tóxicos para a medula óssea do que para os rins ou o fígado e a infertilidade em fêmeas e machos pode ser uma das consequências da sua administração (Coppoc, 2009).

Os fármacos alquilantes actuam provocando a formação de uma ligação covalente entre moléculas de ADN após a inserção de um grupo alquilo.

Estes fármacos têm um largo espectro de acção antitumoral sendo úteis no tratamento de tumores do sistema linforreticular. No entanto a sua actividade é algo limitada contra sarcomas e carcinomas.

Há várias subclasses destes fármacos, tais como: mostardas de azoto (ciclofosfamida, clorambucilo, melfalano) e nitrosoureas (carmustina, lomustina) e outros como busulfan e dacarbazina.

1.2.1.1. Mostardas de azoto

Estas substâncias são especialmente tóxicas para os linfócitos e medula óssea e por isso provocam imunossupressão e mielossupressão profunda, ambos factores limitantes da dose utilizada no tratamento. Em doses elevadas podem também ser gravemente tóxicas para o

aparelho gastrointestinal, no entanto proporcionalmente esta tendência é menos marcada que noutros grupos de fármacos (Coppoc, 2009).

De seguida destacam-se alguns dos fármacos mais utilizados.

A ciclofosfamida é muito utilizada em medicina veterinária, especialmente em protocolos de associação com outros fármacos, no tratamento de linfoma e diversos tipos de sarcomas e carcinomas. Os efeitos secundários mais importantes estão relacionados com a mielossupressão pelo que são consequências possíveis do tratamento uma neutropénia e trombocitopénia ligeiras, com *nadir* entre os 7 a 10 dias após administração (Coppoc, 2009). A ocorrência de náuseas e vómitos não é tão frequente, embora tenha sido relatado vómito em gatos sujeitos a doses elevadas (Fetting, McCarthy, Borison & Colvin, 1982). Quando são administradas, a gatos, em doses superiores a 300 mg/kg estes apresentam neurotoxicidade reversível. Em cães de pêlo de crescimento contínuo pode ocorrer alopecia. Tanto em cães como em gatos, foi também associada à administração de ciclofosfamida, o aparecimento de cistites hemorrágicas necrosantes estéreis (Coppoc, 2009).

A mecloretamina é hoje em dia muito raramente utilizada a não ser no tratamento de recidivas de linfoma canino e como um dos elementos do protocolo mecloretamina, vincristina, procarbazona e prednisona (MOPP) (Rassnick et al., 2002).

O *melfalan* é mais utilizado em medicina veterinária no tratamento de mieloma múltiplo tendo já sido utilizado no tratamento do melanoma maligno. Provoca mielossupressão e a sua utilização prolongada pode levar ao aparecimento de trombocitopénia. A alopecia é outro dos possíveis efeitos secundários deste fármaco (Lana, 2003).

O clorambucilo é por vezes utilizado como substituto da ciclofosfamida, uma vez que apresenta uma menor toxicidade para a bexiga (Coppoc, 2009). Este fármaco é utilizado no tratamento do mastocitoma canino, da leucemia linfocítica crónica, do linfoma e de alguns tumores em gatos. A sua administração está associada a toxicidade gastrointestinal ligeira, mielossupressão e raramente toxicidade cerebelar quando administrado em doses elevadas. A alopecia ocorre muito raramente (Lana, 2003).

1.2.1.2. Nitrosoureas

Estes fármacos são alquilantes bifuncionais, podendo levar à formação de uma ligação entre duas moléculas de ADN ou entre uma molécula de ADN e uma proteína.

Como são substâncias muito lipossolúveis podem ser utilizadas no tratamento de tumores do sistema nervoso central (Coppoc, 2009). São também utilizadas no tratamento de recidivas de linfoma em cães e em protocolos terapêuticos de associação com outros fármacos (LeBlanc et al., 2006).

A mielossupressão cumulativa e a trombocitopénia, que em cães atingem o seu máximo 7 a 10 dias após a administração, são factores limitantes da utilização destes fármacos (Coppoc, 2009).

As nitrosoureas usadas na prática clínica são: a carmustina e a lomustina.

A lomustina é utilizada com algum sucesso em cães, no tratamento de linfoma e mastocitoma e também mostra alguns indícios de sucesso no tratamento de linfoma em gatos (Fan, 2003). Este fármaco tem efeitos adversos na medula óssea, fígado, rins e aparelho gastrointestinal. Na dose recomendada de $100\text{mg}/\text{m}^2$, o factor limitante do tratamento é a neutropénia aguda acompanhada de trombocitopénia com nadir 7 a 14 dias após a administração. Como a lomustina é metabolizada no fígado é necessário ter um cuidado especial com os animais com alterações hepáticas (Coppoc, 2009).

A carmustina tem sido testada no tratamento de recidivas de linfoma em cães como parte integrante do protocolo terapêutico de associação dos fármacos carmustina, vincristina, procarbazona e prednisona (BOPP) (LeBlanc et al., 2006). Esta substância pode provocar mielossupressão grave a longo-prazo e também náuseas e vômitos (Lana, 2003).

1.2.1.3. Outros agentes alquilantes

O *busulfan* e a dacarbazina utilizados em medicina humana, ainda são muito pouco utilizados em medicina veterinária (Coppoc, 2009).

1.2.2. Compostos platinados

Os compostos platinados (cisplatina, carboplatina) têm um mecanismo de acção semelhante ao dos agentes alquilantes, pois provocam ligações químicas fortes com nucleófilos como o azoto nos ácidos nucleicos e o enxofre nas proteínas. Estes fármacos são eficazes contra células em divisão e células em repouso, apesar da cisplatina ter um efeito máximo contra células no final da fase G1 do ciclo celular. Apesar destas semelhanças apresentam diferenças significativas nos seus efeitos antitumorais e toxicidade. A cisplatina é um fármaco único entre os citotóxicos pois é um composto inorgânico. Contém dois átomos de cloro e dois grupos amina todos com a conformação “cis”. Os derivados “trans” não são eficientes como fármacos antitumorais. Nos outros citotóxicos deste grupo, os átomos de cloro foram substituídos por grupos orgânicos conduzindo à alteração da toxicidade dos mesmos. Por exemplo a cisplatina produz nefrotoxicidade e neurotoxicidade ao contrário da carboplatina que produz toxicidade hematopoiética (Coppoc, 2009).

A Cisplatina tem sido utilizada em cães no tratamento do carcinoma das células de transição, carcinoma das células escamosas, osteossarcoma e adenocarcinoma nasal (Knapp, Richardson, Bonney & Hahn 1988; Hahn, Knapp, Richardson & Matlock, 1992). Está contra-indicado em gatos pois provoca toxicidade pulmonar fatal. A nefrotoxicidade é um dos efeitos secundários limitantes da utilização da cisplatina. Outros efeitos tóxicos provocados pela cisplatina são náusea e vômitos (mesmo utilizando anti-eméticos), ototoxicidade, reacções do tipo anafiláctico e neurotoxicidade. Comparando com os agentes

alquilantes a mielossupressão provocada é ligeira, no entanto pode surgir trombocitopénia e granulocitopénia entre 7-9 dias e 17-19 dias, respectivamente, após a administração. Também pode ser observado algum grau de toxicidade gastrointestinal manifestado por diarreia e anorexia (Coppoc, 2009).

A Carboplatina é uma substância análoga da cisplatina e que é eficaz no tratamento de diferentes tumores em animais, incluindo osteossarcoma em cães (Chun & Lorimier, 2003). Ao contrário da carboplatina não foi demonstrado nenhum grau de eficácia no tratamento do carcinoma das células de transição em cães (Morrison, 2002). Uma das vantagens em relação à cisplatina é poder ser utilizada mais facilmente em regime ambulatorio e poder ser administrada a gatos.

O seu principal efeito adverso é a depressão da medula óssea. Em cães pode surgir leucopénia e trombocitopénia graves duas semanas após a administração em doses elevadas (Page et al., 1993). A náusea e o vômito, apesar de frequentes são menos graves do que no caso da cisplatina. A carboplatina não é nefrotóxica. O factor limitante da sua utilização em gatos é a neutropénia (Coppoc, 2009).

1.2.3. Antimetabolitos

Os antimetabolitos funcionam interferindo com a biossíntese de ácidos nucleicos, mimetizando os metabolitos normais e inibindo assim as reacções enzimáticas. Como as células são muito mais sensíveis a alguns antimetabolitos quando se encontram na fase S do ciclo celular, esses mesmos antimetabolitos são considerados dependentes da fase do ciclo celular (Coppoc, 2009).

1.2.3.1. Análogos do ácido fólico

Os fármacos deste grupo incluem agentes que têm como alvo diferentes enzimas que interferem na síntese de ADN, tais como: inibidores da dihidrofolato reductase (metotrexato, edatrexato e trimetrexato), timidilato sintetase (raltitrexedo), glicinamida ribonucleótido formiltransferase (GARFT), aminoimidazol carboxamida formil transferase (AICARFT) (lometrexol) e várias enzimas dependentes do folato (pemetrexedo). A aminopterina é o primeiro derivado do ácido fólico a liderar a introdução dos antimetabolitos no tratamento do cancro. Esta substância provoca apenas uma breve indução da remissão mas permitiu o desenvolvimento do metotrexato (Coppoc, 2009).

O metotrexato inibe a conversão do ácido fólico em ácido tetrahidrofólico, ligando-se à enzima dihidrofolato reductase, levando assim à inibição da síntese de purina e timidina, essenciais para a replicação de ADN. Este fármaco é utilizado, em associação com outros, no tratamento de linfossarcoma, osteossarcoma (Morrison, 2002), tumor venéreo

transmissível, alterações mieloproliferativas e tumores das células de Sertoli (Lana, 2003). A mielossupressão e a mucosite gastrointestinal são os principais efeitos adversos deste fármaco nas doses normalmente utilizadas em animais. Se forem utilizadas doses mais elevadas é aconselhável monitorizar a função renal antes e durante a sua utilização pois o metotrexato provoca necrose tubular em doses elevadas (Coppoc, 2009).

1.2.3.2. Análogos das pirimidinas

Como os ácidos nucleicos estão envolvidos no controlo da multiplicação celular, foi feito um esforço no sentido de descobrir as substâncias análogas das purinas e das pirimidinas, que interferem no processamento do ADN e/ou ARN de modo a inibir o crescimento ou eliminar células cancerígenas.

A citarabina é um análogo das pirimidinas que inibe a síntese de ADN, possivelmente através da inibição da polimerase de ADN, sendo assim dependente do ciclo celular (Lana, 2003). Tem sido utilizado no tratamento de doenças linfoproliferativas e mieloproliferativas, tanto em cães como em gatos. Este fármaco atinge concentrações terapêuticas no líquido céfalo-raquidiano, sendo assim utilizado no tratamento de linfoma e leucemia com envolvimento do sistema nervoso central (SNC), em cães e em gatos. Como factor limitante da dose utilizada surge a supressão da medula óssea. Esta manifesta-se através de leucopénia, trombocitopénia, anemia e megaloblastose (Coppoc, 2009).

A gemcitabina é um análogo da desoxicidina, metabolito activo incorporado no ADN, resultando a acção desta substância na inibição da síntese deste último (Lana, 2003). É utilizada no tratamento de vários tipos de tumores em cães (Kosarek, Kisseberth, Gallant & Couto, 2005; Moore & Kitchell, 2003). No entanto alguns cães são especialmente sensíveis a este fármaco e podem mostrar sinais de toxicidade quando são administradas doses superiores ou iguais a 675mg/m². A mielossupressão é o factor limitante da dose utilizada podendo também surgir sinais de toxicidade gastrointestinal (Coppoc, 2009).

O 5-Fluoroacil é transformado num nucleótido, que incorporado no ARN vai alterar a síntese de ADN (Lana, 2003). Ainda pouco utilizado em medicina veterinária, parece mostrar sinais de sucesso no tratamento de cães com carcinoma mamário na fase pós-operatória em combinação com a ciclofosfamida (Karayannopoulou et al., 2001). É também utilizado no tratamento, por via tópica, do carcinoma das células escamosas em cavalo (Fortier & Mac Harg, 1994). Podem ocorrer efeitos neurotóxicos fatais em gatos e por isso este fármaco não deve ser utilizado nesta espécie. Outros efeitos secundários incluem toxicidade gastrointestinal, mielossupressão e neurotoxicidade ligeira em cães (Lana, 2003).

A capecitabina é um derivado oral da fluoropirimidina que facilita a administração e a exposição continuada ao fármaco. A sua utilização em medicina veterinária ainda não está bem estabelecida (Coppoc, 2009).

1.2.4. Produtos naturais

1.2.4.1. Alcalóides da vinca

Os alcalóides da vinca são substâncias complexas, e de grandes dimensões, derivadas da planta *Vinca rosea*. Apesar de estruturalmente semelhantes, o sulfato de vincristina, o sulfato de vimblastina e a vinorelbina apresentam eficácias antitumorais e perfis de toxicidade muito díspares. Estes agentes ligam-se aos microtúbulos impedindo a formação do fuso acromático, resultando na interrupção da divisão celular, sendo dependentes do ciclo celular (Coppoc, 2009).

A vincristina é um dos fármacos mais utilizados em oncologia veterinária. É excretada pelo fígado para as fezes numa forma inactiva. Se existir previamente algum grau de insuficiência hepática pode ocorrer uma diminuição do metabolismo do fármaco e aumento da toxicidade do mesmo. Esta substância é utilizada como agente único no tratamento do tumor venéreo transmissível (Coppoc, 2009) e em combinação com outros citotóxicos no tratamento de linfoma, leucemia, sarcomas e mastocitoma. Provoca também uma libertação prematura de plaquetas dos megacariócitos podendo ser utilizada no manejo médico da trombocitopénia (Lana, 2003).

A vimblastina é utilizada no tratamento de mastocitoma e linfoma. No tratamento de mastocitoma metastático em cães provou-se eficaz a combinação de vimblastina e prednisona (Govier, 2003). Esta substância é metabolizada no fígado e excretada na biliar/fezes e se existir algum grau de insuficiência hepática pode ocorrer um aumento da toxicidade deste citotóxico. A vimblastina causa mielossupressão (nadir 4 a 9 dias), alopecia, toxicidade gastrointestinal ligeira e é um agente vesicante capaz de provocar uma reacção tecidular acentuada se administrado perivascularmente. Está também documentado algum grau de neurotoxicidade mas menos comum e mais ligeiro que aquele que se verifica com a vincristina (Lana, 2003).

1.2.4.2. Taxanos

Os taxanos são alcalóides derivados de plantas. Actualmente são utilizados na prática clínica o paclitaxel, derivado da casca do teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*) e o docetaxel, composto semi-sintético derivado das agulhas do teixo Europeu (*Taxus bacata*). Estes citotóxicos ligam-se aos conjuntos de microtúbulos e impedem a sua separação inibindo assim o completar da mitose e por isso são dependentes do ciclo celular (Lana, 2003). A eficácia destes dois fármacos no tratamento oncológico, em animais, ainda não é bem conhecida pois ainda estão a ser dados os primeiros passos na sua utilização. Os taxanos apresentam baixa hidrosolubilidade sendo necessários surfactantes não iónicos de modo a possibilitar a sua administração endovenosa. Esses mesmos surfactantes não são farmacologicamente inertes mas são indispensáveis, apesar de interferirem com as

propriedades farmacocinéticas e a toxicidade das formulações comerciais disponíveis de taxanos (Coppoc, 2009).

O paclitaxel é utilizado no tratamento do carcinoma mamário e de alguns tipos de sarcomas com sucesso variável. Este fármaco tem de ser dissolvido em ricinoleato de macrogolglicerol (cremophor® EL) provocando assim uma reacção significativa de hipersensibilidade em cães. Por esta razão deve ser administrado difenidramina (4mg/kg i.m.), cimetidina (4mg/kg via endovenosa (EV)) e dexametasona (2mg/kg EV) trinta minutos antes, de modo a prevenir essa mesma reacção. Pode surgir ainda mielossupressão (nadir 3-5 dias) e muito raramente toxicidade gastrointestinal (Lana, 2003).

1.2.4.3. Epipodofilotoxinas

A podofilotoxina é um extracto da planta mandrágora que possibilitou o desenvolvimento de dois derivados sintéticos: o tenipósido e o etopósido. Ambos os fármacos se tornaram bastante importantes no combate a vários tipos de tumores em medicina humana, mas em medicina veterinária ainda não foi encontrada nenhuma aplicação para estas substâncias (Coppoc, 2009).

1.2.4.4. Camptotecinas

São conhecidos dois derivados do alcalóide camptotecina utilizados em medicina humana o topotecano e o irinotecano. Ainda não foram publicados estudos clínicos sobre a sua utilização em animais (Coppoc, 2009).

1.2.4.5. Antibióticos - Inibidores das topoisomerases

As topoisomerases são enzimas que controlam e modificam a topologia do ADN. Os núcleos das células dos mamíferos possuem várias formas isoméricas da topoisomerase I e II. Estas enzimas quebram a cadeia de ligações fosfodiéster do ADN, criam uma ligação covalente com a molécula de ADN que permite que uma cadeia simples ou dupla atravesse a abertura criada voltando depois a encerrá-la. Os inibidores das topoisomerases impedem o encerramento das cadeias de ADN ligando-se a estas e formando um complexo ADN/topoisomerase que causa, na cadeia de ADN, quebras letais para a célula. A doxorubicina e a dactinomicina inibem tanto a topoisomerase I como a II. A topoisomerase II é inibida pelas antraciclinas e epipodofilotoxinas. O mecanismo exacto através do qual os inibidores das topoisomerases provocam morte celular ainda não foi bem esclarecido.

1.2.4.6. Antraciclinas

O primeiro derivado da antraciclina, a doxorubicina, foi isolado a partir do *Streptomyces* spp. A daunorubicina, a epirubicina e a idarrubicina são derivados semi-sintéticos. Neste

campo, as antraciclina são compostos em que os anéis de tetraciclina foram substituídos pelo açúcar daunosamina (Coppoc, 2009).

A doxorubicina é um antibiótico que apresenta vários mecanismos de acção. Assim pode actuar por interrupção das cadeias de ADN, promoção da formação de radicais livres e inibição das topoisomerases (Lana, 2003). É utilizada, como fármaco único ou em protocolos de associação de fármacos, no tratamento de carcinoma da tiróide, linfossarcoma, hemangiossarcoma, osteossarcoma, carcinoma mamário, carcinoma espinocelular e carcinoma das células de transição (Klein, 2003; Henry, 2003; Sorenmo, 2003; Chun & de Lorimier, 2003; Kent, Strom, London & Seguin, 2004). A cardiotoxicidade é, normalmente, o factor limitante da terapêutica com a doxorubicina em cães (Mauldin et al., 1992). Pode ocorrer em qualquer altura e em diferentes doses, surgindo normalmente na forma de arritmias. Estas arritmias são mais frequentes se já existirem problemas cardíacos, se for efectuado em simultâneo tratamento com radiação na região torácica ou se for administrada em simultâneo ciclofosfamida. A cardiotoxicidade pode manifestar-se ainda como insuficiência cardíaca congestiva, degeneração do miocárdio e fibrose do mesmo, conduzindo a insuficiência cardíaca. Esta toxicidade ocorre normalmente em doses cumulativas superiores a 240mg/m^2 (Barton, 2001). Os gatos usualmente não demonstram sinais de cardiotoxicidade associada à administração de doxorubicina. No entanto, já foi revelada através de ecocardiografia e avaliação histológica, deterioração do miocárdio em gatos tratados com doses cumulativas de 170mg/m^2 a 240mg/m^2 (O'Keefe, Sisson, Gelberg, Schaeffer & Krawiec, 1993). Em gatos foi também evidenciada a existência de toxicidade renal associada à terapêutica com doxorubicina. Outro dos efeitos adversos possíveis deste fármaco é uma anorexia grave, em gatos e em cães pequenos. A mielossupressão, na maioria das vezes, tem início no quarto dia após a administração desta substância e atinge o *nadir* entre os dias 10 e 14. A doxorubicina apresenta uma grande afinidade para os mastócitos, levando à sua desgranulação, sendo assim responsável pelo desenvolvimento de reacções anafilácticas, urticária e eritema generalizado em cães. Se for administrada perivascularmente poderão ocorrer flebites graves e necrose tecidual (Barton, 2001).

A daunorubicina apresenta um mecanismo de acção e toxicidade semelhantes à doxorubicina mas possui um efeito cardiomiopático mais marcado. Não é tão eficaz contra tumores sólidos mas parece ser útil no tratamento de leucemias linfocíticas e granulocíticas em combinação com a citarabina (Coppoc, 2009).

A idarrubicina é um análogo sintético da doxorubicina mas com características mais lipofílicas que a última. É utilizada no tratamento do linfossarcoma em gatos. Pode ser administrado por via oral e é menos cardiotoxíco. No decurso da sua utilização foi observada toxicidade gastrointestinal e mielossupressão em gatos (Coppoc, 2009).

A epirubicina é um estereoisómero da doxorubicina com características lipofílicas melhoradas e menos efeitos adversos (Coppoc, 2009). Este fármaco tem as mesmas

utilizações terapêuticas que a doxorubicina mas é maioritariamente utilizado no tratamento de linfoma e leucemia (Lana, 2003).

1.2.4.7. Antracenedionas

Neste grupo encontra-se a mitoxantrona, que foi produzida com o objectivo de se encontrar uma alternativa menos tóxica às antraciclinas das quais difere pela ausência do anel de tetraciclina e do grupo açúcar (Coppoc, 2009). A sua utilização terapêutica encontra-se no tratamento linfoma (como auxiliar do tratamento ou como substituta da doxorubicina), carcinoma das células de transição e carcinoma das células escamosas (Lana, 2003). Em relação à doxorubicina apresenta um espectro de acção antitumoral mais reduzido, mas é menos cardiotoxico, provoca menos náuseas e vômito e menos lesões devido a extravasão, tudo isto provavelmente devido à menor capacidade da mitoxantrona para produzir radicais livres (Coppoc, 2009).

1.2.4.8. Enzimas

A L-asparaginase é uma enzima derivada da bactéria *Escherichia coli* ou da bactéria *Erwinia chrysanthemi*. Este fármaco inibe a enzima asparagina sintetase e esgota os níveis de asparagina circulante, a qual é essencial para o crescimento das células tumorais. Ao administrar a L-asparaginase esta vai hidrolisar a asparagina circulante, em ácido aspártico e amoníaco, privando as células tumorais de um nutriente muito importante e conduzindo à morte celular. Como a L-asparaginase é uma proteína estranha ao organismo pode induzir a formação de anticorpos e conduzir ao aparecimento de resistência à enzima (Coppoc, 2009).

É utilizada no tratamento de linfoma em cães, como elemento de protocolos associação de fármacos (Lana, 2003).

Os principais efeitos secundários deste fármaco são anafilaxia, pancreatite e alterações da coagulação que podem provocar trombozes e hemorragias intracranianas (Duval et al., 2002).

1.2.5. Hormonas e antagonistas

Os estrogénios, progestagénios, androgénios, corticoesteróides e hormonas da tiróide são utilizados no tratamento de neoplasias mas apenas como parte de protocolos terapêuticos paliativos.

Os estrogénios, inibidores da aromatase, antiestrogénios e antiandrogénios são ainda muito pouco utilizados em medicina veterinária. No entanto merecem-nos uma referência particular os corticosteróides.

1.2.5.1. Corticosteróides

Os corticosteróides, na maioria das vezes a prednisolona, têm sido utilizados com duas finalidades terapêuticas, tratamento paliativo de tumores não linfóides, como tumores cerebrais, diminuindo a inflamação e o edema, e ainda no tratamento de tumores linforreticulares e mastocitomas com efeitos citotóxicos (Coppoc, 2009).

Nas condições ideais os corticosteróides devem ser utilizados em doses elevadas durante o menor intervalo de tempo possível de forma a induzir remissão do tumor efectuando-se de seguida o desmame rapidamente (Coppoc, 2009).

A utilização destes fármacos em doses elevadas, conduz a longo prazo, à ocorrência de toxicidade e hiperadrenocorticismos iatrogénicos (Coppoc, 2009).

Os efeitos tóxicos da prednisona incluem úlcera gástrica, osteoporose, aumento da susceptibilidade a infecções, polidipsia, poliúria, polifagia e taquipneia.

Por vezes estes fármacos são também utilizados no maneio das complicações do próprio tumor (ex.: estimular o apetite e diminuir a reacção à morte celular). Além de tudo isto podem ser úteis no maneio médico de vários sintomas associados às neoplasias como dor, hipercalcémia, hipoglicémia e aumento da pressão intracraniana (Coppoc, 2009).

1.2.6. Outros citotóxicos

1.2.6.1. Hidroxiureia

A hidroxiureia funciona como um antimetabolito inibindo a ribonucleotídeo redutase limitando assim a disponibilidade de desoxirribonucleótidos necessários à síntese de ADN. É um fármaco dependente da fase do ciclo celular, actuando na fase S.

Raramente é utilizada em oncologia veterinária sendo por outro lado utilizada no tratamento da policitémia *vera* (Coppoc, 2009).

1.2.6.2. Inibidores das cicloxigenases

Já foram obtidos efeitos anti-tumorais significativos pela combinação de inibidores das cicloxigenases com a quimioterapia. A combinação do piroxicam com a doxorubicina foi eficaz no tratamento do linfoma multicêntrico em cães mas não mais eficaz que a doxorubicina isolada (Mutsaers et al., 2002).

O *firocoxib*, inibidor das cicloxigenases-2 (cox-2), apresenta um conjunto de características que o torna um fármaco promissor no tratamento de diferentes tipos de neoplasias tanto em canídeos como em felídeos. Algumas dessas características são: ser bem tolerado no tratamento a longo prazo (7 a 9 meses); não terem sido encontrados efeitos secundários relacionados com a administração deste fármaco; apresentar uma eficácia comparável ao *piroxicam* (inibidor não-específico das cicloxigenases), mas ser aparentemente melhor tolerado; ser de fácil administração e permitir uma boa qualidade de vida; estudos

preliminares sugerirem que o *firocoxib* pode ser uma boa escolha no tratamento de tumores em que há sobre expressão das cicloxigenases-2 (cox-2), tais como o carcinoma das células de transição, carcinoma oral das células escamosas e carcinoma prostático nos cães e carcinoma oral das células escamosas e carcinoma das células de transição nos gatos (Magán, N.C., 2008).

Num ensaio clínico em que foi utilizado o *firocoxib* no tratamento do carcinoma das células de transição em cães, conclui-se que administrado como fármaco único ou em associação com a cisplatina possibilita uma boa qualidade de vida. Em associação com a cisplatina, o *firocoxib* permite uma melhor resposta à terapêutica e aumento da esperança média de vida (Magán, N.C., 2008).

O mecanismo do efeito antitumoral destes fármacos ainda não é bem conhecido mas parece incluir efeitos múltiplos. Em estudos *in vitro* com células de osteossarcoma canino foi relatado um efeito antiangiogénico (Royals, Farese, Milner, Lee-Ambrose & Gilder, 2005). O meloxicam, icox-2, provocou apoptose em células de osteossarcoma canino (Wolfesberger et al., 2006).

1.2.7. Novas abordagens e fármacos em estudo

Os recentes desenvolvimentos da biologia e engenharia genética relacionados com o cancro levaram ao aparecimento de novas abordagens no tratamento do mesmo, tais como tratamento com alvos moleculares, ou seja, dirigidos a enzimas ou receptores específicos (Adjei & Hidalgo, 2005).

1.2.7.1. Inibidores do proteossoma

Os proteossomas processam e/ou degradam muitas das proteínas envolvidas no controlo da divisão e crescimento celular e apoptose. O nível de *stress* associado à quimioterapia pode activar os mecanismos de protecção das células dependentes dos proteossomas que protegem a célula da apoptose que de outra maneira seria o resultado da quimioterapia. Através da inibição da acção dos proteossomas a resposta ao *stress* celular diminui e melhora a actividade de alguns quimioterápicos (Coppoc, 2009).

1.2.7.2. Receptores dos factores de crescimento epidérmico

Apesar de normalmente estes factores se encontrarem regulados, na presença de tumores podem estar amplificados ou alterados. A maioria dos tumores, especialmente aqueles que são mais agressivos, é susceptível à inibição destes receptores por diferentes fármacos como o *erlotinib* e *gefitinib*, resultando na interrupção do ciclo celular, promoção da apoptose e inibição da angiogénese (Doroshov, 2005).

1.3. Protocolos de fármacos citotóxicos utilizados em quimioterapia no Hospital Escolar da FMV no tratamento de neoplasias em canídeos no primeiro semestre de 2011

O Hospital Escolar da FMV é um centro clínico de referência em Portugal e possui várias especialidades, incluindo a Oncologia. Tem também ao seu dispor uma variedade de meios auxiliares de diagnóstico, entre os quais, Radiologia, TAC, Ecografia e Laboratório de análises sanguíneas. Com o aumento do número de diagnósticos de doenças neoplásicas em canídeos e felídeos foi criado no hospital o serviço de quimioterapia dirigida a estes animais. A sala onde é realizada a quimioterapia encontra-se isolada do resto das instalações.

Os protocolos quimioterápicos utilizados dependem dos tipos de neoplasias diagnosticadas e após o diagnóstico, dentro dos protocolos possíveis, da escolha do mais adequado para o caso específico de cada animal.

Os canídeos que realizaram quimioterapia no Hospital Escolar da FMV durante o primeiro semestre de 2011 foram mais frequentemente diagnosticados com uma de quatro neoplasias, linfoma, mastocitoma, carcinoma da tiróide e tumor venéreo transmissível.

1.3.1. Tratamento do linfoma

O protocolo mais utilizado no tratamento de linfoma, em cães, no Hospital Escolar da FMV é um protocolo de associação dos fármacos ciclofosfamida (C), doxorrubicina (representada pelo H de hidroxidaunorrubicina), vincristina (O, *Oncovin*, nome do medicamento) e prednisolona (P). Este protocolo é referido abreviadamente por CHOP.

O tratamento é realizado por um período de vinte e cinco semanas. As doses utilizadas para cada um dos fármacos são: ciclofosfamida, 200mg/m²; doxorrubicina, 30mg/m²; vincristina, 0,7mg/m²; prednisolona, 2mg/kg de 24 em 24 horas (*semel in die, sid*) durante 7 dias, 1,5mg/kg *sid* durante 7 dias, 1mg/kg *sid* durante 7 dias e 0,5mg/kg *sid* durante 7 dias. Terminado o tratamento o animal é cuidadosamente monitorizado para a eventual ocorrência de efeitos secundários devidos aos fármacos usados ou uma possível recidiva do tumor.

Os cães que respondem bem a este tratamento e que atingem a remissão completa do tumor ficam, na maioria das vezes, livres de qualquer dos sintomas associados ao linfoma e conseqüentemente recuperam uma boa qualidade de vida. A maioria dos animais tolera bem a quimioterapia e apenas uma pequena percentagem desenvolve sintomas de toxicidade significativa (Nelson & Couto, 2009).

Num estudo publicado no último ano (Sorenmo, Overley, Krick, Ferrara, LaBlanc & Shofer, 2010), foi avaliada a toxicidade de um protocolo de associação de fármacos baseado no CHOP usado no tratamento de linfoma em cães, que utilizava L-asparaginase, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, metotrexato e prednisona. Apesar de este

protocolo utilizar a L-asparaginase e o metotrexato além dos outros 4 fármacos que fazem parte do protocolo CHOP, a maioria dos efeitos adversos encontrados foram associados à administração de doxorrubicina. Neste estudo dois dos cães faleceram devido a doença cardíaca, um dos quais tinha alterações cardíacas compatíveis com cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina. Nos outros 4 casos o protocolo inicial teve de ser alterado, devido a sinais clínicos relacionados com cardiotoxicidade prematura provocada pela doxorrubicina.

1.3.2. Tratamento do Mastocitoma

No tratamento do mastocitoma, e sempre que possível, é realizada a cirurgia para exérese do tumor com uma margem mínima de 2 a 3 centímetros (cm). Se o tumor for de grau 2 ou 3 de malignidade, mesmo que tenha sido extraído com margens limpas, é aconselhada a realização de quimioterapia.

No Hospital Escolar da FMV o protocolo quimioterápico mais utilizado no tratamento deste tipo de neoplasia é uma associação de 2 fármacos, vimblastina e prednisolona. As doses utilizadas são: vimblastina, 2mg/m² em 8 sessões; prednisolona, 1mg/kg *sid* durante 15 dias, 0,5mg/kg *sid* durante 10 semanas. Consoante o caso, outros dos fármacos utilizados no tratamento deste tipo de tumor são a lomustina e o *imatinib*.

Num estudo recente (Rungsipipat et al., 2009), realizado em cães com mastocitoma cuja terapêutica consistiu numa associação de vimblastina e prednisolona, verificaram-se, ao longo do tratamento, alterações nos hemogramas dos animais como anemia, leucocitose e trombocitopénia ligeira.

Numa publicação anterior (Trumel et al., 2005), foram avaliados os efeitos hematológicos adversos de um protocolo de associação de vimblastina, prednisolona e cimetidina, num conjunto de 14 canídeos com mastocitoma. Um dos animais desenvolveu uma gastroenterite hemorrágica e faleceu 3 dias após a sexta sessão de quimioterapia. Outro canídeo, numa fase avançada da doença, faleceu devido a *epistaxis* grave. Num terceiro animal, após a primeira sessão de quimioterapia verificou-se um agravamento das úlceras gastrointestinais previamente diagnosticadas. Um quarto animal desenvolveu uma artrite séptica e teve de efectuar um tratamento com cefalosporina. Em relação a alterações do hemograma, 1 animal desenvolveu neutropénia e trombocitopénia, 2 desenvolveram leucopénia e outros 2 trombocitopénia.

1.3.3. Tratamento do carcinoma da tiróide

Nos animais com carcinoma da tiróide a quimioterapia está indicada quando não é possível a remoção cirúrgica completa do tumor, quando o tratamento com radioterapia de megavoltagem não é eficiente, quando são identificadas metástases ou quando o tamanho do tumor primário é tal que a invasão local ou a metastização são previsíveis, mesmo que não possam ser identificadas através dos meios auxiliares de diagnóstico.

No Hospital Escolar da FMV, para o tratamento deste tipo de tumor administra-se doxorubicina, de 3 em 3 ou de 6 em 6 semanas, por via endovenosa, na dose de 30mg/m² (Nelson & Couto, 2009).

A terapêutica com a dose padrão de doxorubicina, como fármaco único em cães, não está normalmente associada à imunossupressão. Neste caso os efeitos adversos mais frequentes são gastrointestinais, cardiomiopatia, aumento da libertação periférica de histamina e libertação secundária de catecolaminas, alopecia e hiperpigmentação nalgumas raças de canídeos e necrose tecidual devido a administração perivascular deste fármaco (Barton, 2001).

1.3.4. Tratamento do tumor venéreo transmissível

Alguns tumores venéreos transmissíveis regridem espontaneamente, mas na maioria dos casos tal não acontece. Este tipo de tumor responde a vários agentes quimioterápicos, incluindo a vincristina.

No Hospital Escolar da FMV a vincristina é administrada semanalmente, em média durante 4 a 6 semanas, sendo realizadas duas administrações após o desaparecimento das lesões. Normalmente é atingida a remissão completa do tumor em cerca de 90% dos canídeos tratados apenas com vincristina, sendo que estes animais permanecem livres da doença (Nelson & Couto, 2009).

Em cães com tumor venéreo transmissível (TVT), um dos efeitos adversos associado à terapêutica com vincristina é a mielossupressão (Rogers, Walker & Dillon 1997). Durante o tratamento com este fármaco podem verificar-se várias alterações como neutropénia, eosinopénia, linfocitose, monocitose, diminuição da concentração de hemoglobina, do número total de eritrócitos e do número total de leucócitos (Dinesh, Ranganath, Jayadevappa & Srinivas, 1993). Num estudo foi relatada leucopénia em 5% dos animais tratados com vincristina (Calvert, Leifer & MacEwen, 1982) e num segundo foi relatada neutropénia em 25% dos canídeos (Erunal-Maral, Findik & Aslan, 2000).

1.4. Parvovírus canino

1.4.1. Etiologia

O parvovírus canino (PVC) é um vírus de ADN de cadeia linear simples que pertence à família *Parvoviridae*. Este vírus é de pequenas dimensões (25 nanómetros (nm)), não tem envelope e necessita de infectar células de divisão rápida, como células epiteliais das criptas de *Lieberkuhn*, células precursoras da medula óssea ou células do músculo cardíaco, para se poder multiplicar. Tem a capacidade de provocar doença numa grande variedade de espécies de mamíferos, apesar de a maioria dos parvovírus serem específicos para determinada espécie (Goddard & Leisewitz, 2010).

1.4.2. Epidemiologia

O parvovírus canino, ou PVC, foi descoberto em 1967 como causa de doença gastrointestinal e respiratória em cães, sendo chamado de *minute virus of canines* (MVC) (Binn, Lazar, Eddy & Kajima, 1970). Mais tarde a sua designação foi alterada para PVC-1. A maioria dos animais infectados com PVC-1 é assintomática (Lamm & Rezabek, 2008). Em 1978, surgiram nos Estados Unidos da América, surtos de uma doença intestinal contagiosa de origem desconhecida. No entanto o agente responsável foi isolado, demonstrando-se que se tratava de uma nova espécie do género *Parvovirus* que assim foi denominado PVC-2. Face à falta de imunidade prévia, na população canina, o vírus propagou-se rapidamente e em 1980 podia ser encontrado por todo o globo (Lamm & Rezabek, 2008).

No início a infecção pelo PVC-2 era responsável por uma morbilidade e mortalidade elevadas na população canina *naïve* mas após a introdução da vacinação, os surtos de doença ficaram limitados a animais não vacinados ou vacinados de forma incorrecta e a animais em ambiente de canil (Goddard & Leisewitz, 2010).

Na década de 1980 emergiu uma nova estirpe de PVC-2 designada PVC-2a. Este vírus sofreu rapidamente uma nova mutação surgindo uma nova estirpe em 1984, PVC-2b (Parrish, Have, Foreyt, Evermann, Senda & Carmichael, 1988). Actualmente o PVC-2a e o PVC-2b são as estirpes mais comumente causadoras de doença na população canina mundial. Na última década surgiu uma nova estirpe, o PVC-2c, que foi encontrada em primeiro lugar em Itália no ano 2000 mas a sua presença foi rapidamente relatada em locais como Vietname, Espanha, Estados Unidos da América, América do Sul, Portugal, Alemanha e Reino Unido. Esta última estirpe é reconhecida como altamente virulenta, causadora de morbilidade elevada e morte rápida (Goddard & Leisewitz, 2010).

A enterite aguda provocada pelo PVC-2 pode surgir em cães de qualquer raça, idade ou sexo. Os cachorros entre as 6 semanas e os 6 meses de idade aparentam ser mais susceptíveis (Pollock & Coyne, 1993; Prittie, 2004). Durante as primeiras semanas de vida os cachorros encontram-se protegidos contra a infecção pelos anticorpos de origem materna

(AOM), desde que a progenitora os possua. Por esta razão a parvovirose raramente surge em recém-nascidos (Pollock & Carmichael, 1982). No entanto, os anticorpos de origem materna têm um tempo de semi-vida de aproximadamente 10 dias, pelo que à medida que o título de anticorpos diminui os cachorros tornam-se mais susceptíveis à infecção (Pollock & Carmichael, 1982).

Existem vários factores que predispõem à infecção pelo parvovirus em cachorros, tais como a inexistência de imunidade protectora, o parasitismo intestinal e ainda ambientes sobrelotados e com deficientes condições de higiene (Smith-Carr, Macintire & Swango, 1997).

Raças como rottweiler, doberman pinsher, american pit bull terrier, labrador retriever e pastor alemão, demonstram maior predisposição para uma forma mais grave da enterite por PVC (Smith-Carr et al., 1997; Houston, Ribble & Head, 1996). Além dos factores genéticos que contribuem para esta predisposição há outros factores como a popularidade de cada raça e falta de protocolos de vacinação correctos. Os cães com idades superiores a 6 meses e os machos não castrados, parecem ser mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença do que fêmeas não esterilizadas (Prittie, 2004).

1.4.3. Patogénese

O PVC-2 é facilmente transmitido através da via fecal-oral (transmissão directa) ou pela via oro-nasal devido a exposição a fómites contaminados com fezes (transmissão indirecta) (Smith-Carr et al., 1997). A multiplicação viral começa no tecido linfóide da orofaringe, linfonodos mesentéricos e timo disseminando-se de seguida para as criptas de *Lieberkuhn* do intestino delgado por via hematogénea (3 a 4 dias após a infecção). Entre 1 a 5 dias após a infecção surge uma virémia acentuada. Posteriormente à virémia, o PVC-2 vai localizar-se predominantemente no epitélio da língua, cavidade oral, esófago, intestino delgado, medula óssea e tecidos linfóides tais como timo e nódulos linfáticos (Macartney, McCandlish, Thompson & Cornwell, 1984; Meunier, Cooper, Appel & Slauson, 1985; Meunier, Cooper, Appel, Lanieu & Slauson, 1985).

Tanto o PVC-1 como o PVC-2 são muito estáveis e resistentes no ambiente. O PVC-2 pode persistir em objectos como roupa, comedouros e também no pavimento das jaulas durante 5 meses ou mais. A maioria dos detergentes e desinfectantes não tem a capacidade de inactivar o este vírus. A excepção é o hipoclorito de sódio (uma parte de lixívia diluída em trinta partes de água) (McCaw & Hoskins, 2006)

O ritmo a que ocorre a renovação celular nos tecidos linfóides e no intestino parece ser um dos principais factores que vai determinar a gravidade da doença, pois ritmos mais elevados de renovação significam multiplicação viral e destruição celular mais acentuadas.

Causas de *stress*, particularmente parasitismo e causas inespecíficas (ex.: desmame) podem predispor o animal para o desenvolvimento de doença devido à maior actividade

celular característica destas situações (Smith-Carr et al., 1997; O'Sullivan, Durham, Smith & Campbell, 1984).

Durante o desmame, os enterócitos das criptas de *Lieberkuhn* têm um índice mitótico mais elevado devido às alterações da microbiota e da dieta, logo são mais susceptíveis ao tropismo viral para células em rápida divisão celular (Houston et al., 1996). As células epiteliais das criptas de *Lieberkuhn* ao amadurecerem migram do epitélio germinal das criptas até à extremidade das vilosidades intestinais. Ao atingi-las adquirem a capacidade de absorver nutrientes. O parvovírus infecta o epitélio germinal das criptas de *Lieberkuhn* levando à destruição do epitélio e das vilosidades. Como resultado, a renovação celular normal, habitualmente de 1 a 3 dias, no intestino delgado, é comprometida, provocando uma atrofia e encurtamento das vilosidades, alterações características desta doença (Smith-Carr et al., 1997; Otto, Drobotz & Soter, 1997). Durante este período de atrofia das vilosidades o intestino perde a capacidade de absorver os nutrientes.

Surgem também lesões de realçar no timo; são mais óbvias nos centros germinais e no córtex, reflectindo o tropismo do PVC para as células activas mitoticamente. Ocorre ainda uma linfocitólise extensa no córtex do timo, comparada com a que ocorre nos outros tecidos linfóides, demonstrando mais uma vez o elevado índice mitótico das células deste órgão, não sendo por isso uma surpresa a gravidade da linfopénia que se verifica em cachorros infectados com o vírus (Smith-Carr et al., 1997; Macartney, McCandlish, Thompson & Cornwell, 1984).

A excreção fecal do vírus tem início apenas 3 dias após a infecção e pode continuar por um período máximo de 3 a 4 semanas após doença ou doença subclínica (Goddard & Leisewitz, 2010).

1.4.4. Diagnóstico

Pode ser feito um diagnóstico presuntivo através da observação em cachorros não vacinados de um quadro clínico agudo de vômito, diarreia, depressão, desidratação, febre e leucopénia, no entanto este diagnóstico deve ser definitivo. Este pode ser realizado de diversas formas, tais como a demonstração da presença de PVC nas fezes, detecção de anticorpos contra o PVC no soro sanguíneo, e a necrópsia e análise histopatológica, no caso de morte do animal (Goddard & Leisewitz, 2010).

O diagnóstico de uma infecção activa por PVC, através da serologia, implica a detecção de anticorpos anti-PVC produzidos recentemente, ou seja anticorpos da classe das imunoglobulinas M (IgM) em animais com sinais clínicos típicos de parvovirose. Na prática clínica pode ser utilizado um teste rápido, realizado pela técnica de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), que permite demonstrar a presença do PVC nas fezes de cachorros infectados (Goddard & Leisewitz, 2010).

As partículas virais podem ser facilmente detectadas durante o pico da sua disseminação nas fezes (4 a 7 dias após a infecção). No entanto podem obter-se resultados falsos positivos nos 3 a 10 dias após a vacinação do animal com uma vacina viva modificada para o PVC-2 e também podem obter-se resultados falsos negativos devido à ligação de anticorpos neutralizantes ao antigénio presente nas fezes ou por interrupção da disseminação do vírus pelas fezes (Pollock & Coyne, 1993).

Há ainda outros métodos que permitem a detecção do vírus nas fezes como sejam a microscopia electrónica, o isolamento do vírus, a hemaglutinação fecal, a imunocromatografia, e a *polymerase chain reaction* (PCR). Os métodos baseados no PCR, principalmente o PCR em tempo real, provaram ser mais sensível que outras técnicas tradicionais (Desario et al., 2005).

1.4.5. Imunidade após a infecção

Um cachorro que recupera de uma enterite provocada por PVC-2 fica imune à reinfecção durante pelo menos 20 meses e possivelmente para a vida. Quando expostos às várias estirpes de PVC-2, os cachorros que se encontram protegidos não irão apresentar um aumento do título de anticorpos, nem sinais claros de doença ou mesmo excretar vírus através das fezes. Em geral, existe uma boa correlação entre o título de anticorpos no soro sanguíneo, determinado pela prova de inibição da hemaglutinação (HI) ou pela prova de neutralização viral (VN), e a resistência à infecção. Após a ocorrência de enterite por PVC-2 o título de anticorpos permanece elevado por um período de tempo prolongado, mesmo que não ocorra nova exposição ao vírus. Se o título de anticorpos no soro apresenta valores baixos, é possível que se trate de uma infecção localizada. Apesar de poder ajudar na protecção contra a entrada do PVC-2, a secreção de IgA pelo intestino provavelmente não desempenha um papel importante na longevidade da resposta imunitária porque os títulos de anticorpos só persistem até 15 dias após a infecção (McCaw & Hoskins, 2006).

1.4.6. Estabelecimento e duração da imunização

No mercado estão disponíveis várias vacinas vivas atenuadas e inactivadas. Cada uma confere um período diferente de protecção e pode ser utilizada isoladamente, ou em combinação com outras vacinas, de uma forma segura (McCaw & Hoskins, 2006).

As vacinas inactivadas de PVC-2, com carga antigénica suficiente, protegem os cães contra a exposição ao PVC-2 no ambiente. Mas os cães vacinados com esta vacina podem infectar-se, apresentando uma forma subclínica, nas duas semanas após a vacinação. Se a administração dessa mesma vacina for feita em doses sequenciais, forma-se uma resposta imunitária secundária, permanecendo o cão protegido por um período até 15 meses (McCaw & Hoskins, 2006).

Após a administração, de algumas das vacinas vivas atenuadas, pode verificar-se uma linfopénia transitória durante 4 a 6 dias. Na maioria das vacinas vivas atenuadas de PVC, a estirpe vacinal multiplica-se no intestino e durante um curto espaço de tempo é eliminada pelas fezes. Apesar de hipoteticamente poder ocorrer reversão da virulência nas vacinas vivas atenuadas causando doença, vários estudos que utilizaram o PVC-2 vivo modificado, demonstraram que as vacinas são seguras (Kahn, Emery, Smith & Spotts, 1983). As alterações que ocorrem após a administração de uma vacina viva atenuada de PVC-2 são muito semelhantes àquelas que acontecem após a infecção pelo vírus selvagem. Assim, 2 dias após a administração da vacina observa-se virémia e entre os dias 3 e 10 ocorre distribuição sistémica e eliminação do vírus através do aparelho gastrointestinal. Uma das diferenças entre a infecção produzida pela vacina viva atenuada e a produzida pelo vírus selvagem é a menor quantidade de vírus eliminada após a vacinação. A resposta humoral é, no entanto, semelhante nos dois casos (McCaw & Hoskins, 2006).

Os títulos de anticorpos séricos induzidos pela vacinação são detectáveis 3 dias após a vacinação e vão aumentando rapidamente. Mesmo que não seja feito novo reforço da vacina os títulos de anticorpos mantêm-se protectores por um período de tempo até 2 anos, sendo que cães expostos ao vírus durante esse intervalo de tempo não deverão ficar infectados. Apesar dos títulos de anticorpos não serem um indicador absoluto da protecção contra a infecção pelo PVC-2, têm uma boa correlação com a protecção contra a infecção pelo PVC-2 (McCaw & Hoskins, 2006).

Ao contrário do que muitas vezes é referido, o insucesso da vacinação não se deve a diferenças entre a estirpe vacinal e a estirpe selvagem. As principais causas deste insucesso parecem ser a interferência dos anticorpos de origem materna (AOM) com o PVC-2 e a insuficiente seroconversão após a administração da vacina (O'Brien, Roth & Hill, 1986; Pollock & Carmichael, 1982). A idade com que os cachorros podem ser vacinados com sucesso depende de vários factores: título e eficiência da transmissão de anticorpos de origem materna através do colostro nas primeiras 24h de vida e ainda título de antígenos de PVC-2 da vacina e a sua capacidade de induzir uma resposta imunitária. Cachorros de uma cadela com títulos baixos de anticorpos para o PVC-2 podem ser vacinados com sucesso às seis semanas de idade, já cachorros cujas mães têm títulos elevados de anticorpos para o PVC-2 terão de ser vacinados mais tarde pois os anticorpos de origem materna persistem por mais tempo (Pollock & Carmichael, 1982).

1.5. Imunidade

O conceito de imunidade refere-se à “capacidade de um indivíduo resistir a determinada infecção ou doença” (Prescott, Harley & Klein, 2005, p.680, tradução livre). O sistema imunitário é constituído por diferentes células, tecidos e órgãos com a faculdade de reconhecer substâncias e microorganismos estranhos ao organismo e actuar em conjunto de modo a neutralizá-los ou destruí-los (Prescott, et al., 2005).

A imunidade pode ser dividida em dois tipos: imunidade inespecífica, inata ou natural e a imunidade específica, adquirida ou adaptativa. A primeira permite a defesa contra qualquer microorganismo ou substância estranha e inclui um conjunto de mecanismos inatos que funcionam como a primeira linha de defesa do organismo. Este tipo de resposta inespecífica não apresenta memória imunológica, ou seja, sempre que o mesmo microorganismo ou substância estranha é encontrado a resposta imunitária ocorre com a mesma amplitude. A segunda permite a defesa contra um agente específico e além disso esta resposta do tipo específico melhora com a exposição repetida a esses mesmos agentes estranhos ao organismo (Prescott, et al., 2005).

As substâncias que são reconhecidas como estranhas e desencadeiam uma resposta imunitária são denominadas antigénios. Os antigénios fazem com que determinadas células produzam proteínas específicas, os anticorpos que se ligam aos antigénios e os inactivam. Outro tipo diferente de células tem a capacidade de destruir células infectadas por vírus, por exemplo. A imunidade inespecífica e a imunidade específica actuam conjuntamente de modo a eliminar microorganismos patogénicos e outros tipos de agentes invasores.

As células encarregues tanto da defesa específica como da não específica são denominadas leucócitos. Estas células têm origem em células pluripotenciais (do fígado no caso dos fetos ou da medula óssea nos indivíduos adultos), migrando depois para diferentes locais do organismo onde se desenvolvem e desempenham múltiplas funções. Alguns dos leucócitos permanecem nos tecidos (ex.: mucosa intestinal) onde respondem a agressões locais e alertam o sistema imunitário, enquanto outros circulam através do sangue e da linfa sendo recrutados para os locais de infecção (Prescott, et al., 2005).

1.5.1. Imunidade inespecífica

O organismo dos animais possui várias linhas de defesa contra os microorganismos invasores. Em primeiro lugar estão as barreiras físicas (ex.: pele e flora comensal) e só depois surge a imunidade inata ou inespecífica (ex.: inflamação e lisozimas) e por fim a imunidade adquirida ou específica (produção de anticorpos e imunidade mediada por células). Mesmo que um agente invasor consiga atravessar a primeira linha de defesa ainda tem que ultrapassar várias barreiras cada vez mais difíceis de atravessar. A pele, quando intacta, é uma barreira eficaz contra a invasão microbiana. Se estiver danificada podem

surgir processos infecciosos, no entanto o rápido processo de cicatrização faz com que as lesões sejam reparadas rapidamente e a infecção seja limitada. O aparelho gastrointestinal, o aparelho respiratório e o aparelho urinário compreendem também alguns mecanismos físicos de defesa tais como a tosse, o espirro e o transporte mucociliar no aparelho respiratório; o vômito e diarreia, no aparelho gastrointestinal e o fluxo de urina no aparelho urinário. A existência de uma flora comensal na pele e no aparelho gastrointestinal ajuda a manter afastados potenciais organismos patogénicos (Prescott, et al., 2005; Tizard, 2004).

Apesar de auxiliarem na defesa do organismo, as barreiras físicas não são suficientes para afastar microorganismos invasores persistentes. Apesar disso, e visto que a maioria dos animais não se encontra permanentemente doente, grande parte das infecções são rapidamente debeladas sem que se verifiquem quaisquer sinais de doença (Prescott, et al., 2005; Tizard, 2004).

A segunda linha de defesa da imunidade inespecífica inclui mecanismos de defesa químicos e celulares, preexistentes e de acção rápida. A imunidade inata baseia-se no princípio que todos os antígenos são quimicamente diferentes dos constituintes normais do organismo. Nestas condições o organismo possui enzimas capazes de digerir a parede celular de bactérias e outras proteínas que se ligam aos carboidratos existentes à superfície das bactérias, revestindo-as e acelerando a sua destruição. Uma das características deste tipo de resposta imunitária é a capacidade de concentrar os seus mecanismos de acção nos locais de invasão microbiana. Este mecanismo de defesa localizado é denominado inflamação. Durante o processo inflamatório, as alterações ou a deterioração dos tecidos provocadas pela invasão microbiana levam a um aumento do fluxo de sangue e acumulação de células capazes de atacar e destruir os invasores. Estas células, os neutrófilos e os macrófagos, têm a capacidade de destruir a maioria dos microorganismos invasores e impedir a sua disseminação para áreas não infectadas do organismo. Existe também um conjunto de enzimas que fazem parte do chamado sistema complemento, que são capazes de destruir os agentes patogénicos. Algumas das células envolvidas no processo inflamatório são também capazes de reparar os danos existentes nos tecidos (Prescott, et al., 2005; Tizard, 2004).

Os animais também têm um conjunto de moléculas tais como a enzima lisozima, capaz de digerir carboidratos e proteínas com a capacidade de se ligar a carboidratos. Algumas destas moléculas encontram-se em circulação permanente enquanto outras são induzidas pela presença de bactérias ou pela destruição de tecidos (Prescott, et al., 2005; Tizard, 2004).

Uma das características que falta à imunidade inata é algum tipo de memória imunitária. Assim, independentemente de ser a primeira ou enésima vez que se dá um encontro com um determinado agente invasor, a intensidade e duração dos processos imunitários como a

inflamação é a mesma. Por outro lado, qualquer que seja o agente invasor, o organismo está sempre pronto a responder de imediato (Tizard, 2004).

As células *Natural killer* (NK) não pertencem nem à classe dos linfócitos B nem à classe dos linfócitos T e tornam-se activas sem que haja qualquer exposição prévia ao antigénio. Fazem parte da imunidade não específica ou inata e não possuem receptores para antigénios. Estas células são capazes de destruir células infectadas por vírus e a sua actividade é estimulada pelo interferão e pelos anticorpos (Prescott, et al., 2005).

1.5.2. Imunidade específica

A inflamação, e outros constituintes da imunidade inata, são muito importantes na defesa do organismo e se o animal não conseguir activar uma resposta imunitária inespecífica competente irá ser derrotado por infecções esmagadoras (Prescott, et al., 2005; Tizard, 2004).

Apesar de a imunidade inata ser de importância chave, esta não tem a capacidade de providenciar uma solução total para a defesa do organismo. É essencial que o sistema imunitário possa reconhecer, destruir e “aprender” com a experiência. Deste modo quando ocorrer um novo encontro com o mesmo invasor a resposta ocorrerá de modo mais rápido e eficiente. Apesar deste tipo de resposta se desenvolver mais lentamente que a resposta imunitária inata, pois pode demorar vários dias a tornar-se efectiva, é extremamente eficiente de tal forma que após se formar uma resposta contra determinado elemento estranho ao organismo, num novo encontro com o mesmo a probabilidade de este conseguir penetrar no organismo com sucesso é muito baixa (Tizard, 2004).

A imunidade adquirida possui um conjunto de características que a distingue da imunidade inata. Este tipo de imunidade é dirigido a um antigénio concreto e a imunidade contra esse mesmo antigénio não confere imunidade contra outros. Quando exposto novamente ao mesmo antigénio, o organismo reage rapidamente sem que haja o desenvolvimento de doença. Este tipo de resposta imunitária é capaz de gerar uma enorme diversidade de moléculas, como os anticorpos que podem reconhecer inúmeros antigénios diferentes. Por último, a imunidade específica tem a capacidade de distinguir o *self* do *nonself* e reagir apenas contra os antigénios estranhos ao organismo sem o destruir.

Os microorganismos invasores podem ser de dois tipos. Uns têm origem fora do organismo, deste grupo fazem parte a maioria das bactérias e fungos assim como protozoários e helmintos. Outros têm origem ou vivem nas próprias células do organismo e deste segundo grupo fazem parte vírus e bactérias e protozoários intracelulares. Assim a imunidade específica tem de lutar contra dois tipos de agentes invasores. No caso dos agentes com origem no exterior do organismo formam-se glicoproteínas, os anticorpos, que os destroem. A outra vertente da resposta imunitária adquirida é dirigida para os invasores intracelulares ou endógenos que tentam invadir outras células. Neste caso há células especializadas na

destruição das células infectadas ou anormais. Este tipo de resposta imunitária é denominado resposta imunitária mediada por células (Prescott, et al., 2005; Tizard, 2004).

1.5.2.1. Resposta imunitária mediada por anticorpos

Após a exposição a um antígeno, substância estranha ao organismo, *nonself*, tal como uma proteína, nucleoproteína, polissacarídeo ou glicolípido, formam-se anticorpos específicos contra esse antígeno capazes de se ligar a este e assegurar a sua destruição (Prescott, et al., 2005). Os anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas presentes no soro sanguíneo, tecidos e mucosas dos animais vertebrados. As imunoglobulinas podem ser divididas em diferentes classes, imunoglobulinas A (IgA), imunoglobulinas D (IgD), imunoglobulinas E (IgE), imunoglobulinas G (IgG) e IgM (Prescott, et al., 2005). Os plasmócitos, linfócitos B diferenciados, são células produtoras de anticorpos. Um indivíduo é capaz de produzir vários milhões de anticorpos diferentes, mas cada plasmócito produz uma única molécula específica. A ligação de um anticorpo a um antígeno normalmente não provoca a destruição do mesmo. A função dos anticorpos é assinalar os diferentes antígenos para que o sistema imunitário possa responder e activar respostas imunitárias não específicas capazes de destruir esse mesmo antígeno. Por exemplo, o facto de uma bactéria estar coberta por anticorpos torna-a um alvo mais fácil da fagocitose realizada pelos neutrófilos e macrófagos (Prescott, et al., 2005). Os anticorpos são altamente específicos e só estabelecem ligação com o antígeno que estimulou a sua produção (Tizard, 2004). A resposta do sistema imunitário de um animal a uma segunda dose do mesmo antígeno é muito diferente da primeira pois é muito mais rápida e duradoura e os anticorpos atingem números mais elevados. Esta segunda resposta ao mesmo antígeno, resposta secundária, pode ocorrer vários meses ou anos após a primeira exposição ao antígeno mas com o decorrer dos anos a dimensão da resposta tende a diminuir. Mesmo que a primeira resposta, resposta primária, tenha sido tão fraca que não tenha sido detectada, pode ser induzida na mesma uma resposta secundária. O facto de existir uma resposta secundária demonstra que o sistema responsável pela produção de anticorpos tem a capacidade de memorizar a exposição anterior a um antígeno. É importante frisar que mesmo que se façam exposições repetidas ao mesmo antígeno, a resposta imunitária não cresce indefinidamente. O título de anticorpos no sangue encontra-se regulado de maneira que eventualmente pára de aumentar e estabiliza mesmo que ocorra nova exposição ao mesmo antígeno (Tizard, 2004).

1.5.2.2. Resposta imunitária mediada por células

O organismo possui um mecanismo que permite identificar e destruir células estranhas ao organismo, as quais podem apresentar apenas diferenças muito ligeiras em relação às próprias células de um animal, tal como acontece num animal receptor de órgãos ou tecidos

transplantados. Mesmo células com alterações estruturais aparentemente insignificantes podem ser reconhecidas como estranhas e destruídas, é o caso das células infectadas por vírus, células em fim de vida e células neoplásicas (Tizard, 2004).

Os linfócitos T são os elementos principais da resposta imunitária mediada por células, para além de desempenharem um papel importante na activação dos linfócitos B. Estes linfócitos são imunologicamente específicos pois podem reter uma memória imunológica vasta e participam numa grande variedade de mecanismos reguladores e efectores (Prescott, et al., 2005).

Os linfócitos T respondem a fragmentos de antígeno expostos à superfície de células apresentadoras de antígenos, a maior parte das quais são macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Estas células capturam os antígenos, digerem-nos e decompõem-nos em pequenos fragmentos. Esses fragmentos ligam-se a um tipo específico de proteínas chamado complexo maior de histocompatibilidade (MHC) (Prescott, et al., 2005).

Existem duas classes de MHC que desempenham um papel na apresentação de antígenos, são elas o MHC classe 1 (MHC-I), que pode ser encontrado em quase todas as células nucleadas do organismo e o MHC classe 2 (MHC-II), apenas presente nos leucócitos envolvidos em respostas imunitárias relacionadas com os linfócitos T_{Helper} . As moléculas do MHC-I ligam-se a péptidos com origem no citoplasma e este complexo é depois ancorado à membrana plasmática. Se o péptido for estranho ao organismo (ex.: pequenas cadeias proteicas virais), um linfócito T citotóxico, *cluster of differentiation molecules 8⁺* (CD8⁺), cujo receptor do linfócito T (TCR) é específico para o antígeno peptídico apresentado, irá ligar-se ao complexo péptido-MHC e destruir a célula. As moléculas do MHC-II ligam-se a fragmentos com origem em antígenos externos. Neste caso as células apresentadoras de antígenos capturam-nos por endocitose ou fagocitose, digerem-nos em pequenos fragmentos que depois de combinados com as moléculas de MHC-II são exibidos à superfície das células. Os fragmentos são depois reconhecidos por linfócitos T_{Helper} (CD4⁺), que ao contrário dos linfócitos T CD8⁺, não eliminam as células directamente. Assim, os linfócitos T CD4⁺ actuam de duas formas, aumentando o número de linfócitos T CD4⁺ que responde ao antígeno ou então produzindo citocinas, como a interleucina-2 (IL-2), que inibem directamente o agente patogénico que produziu o antígeno ou recrutam e estimulam outras células para participar na resposta imunitária. Os linfócitos T CD4⁺ podem ser divididos em 3 subpopulações, T_H1 , T_H2 e T_H0 . Os linfócitos T_H1 e T_H2 produzem e secretam citocinas variadas. Os linfócitos T_H1 produzem IL-2, interferão gama (IFN- γ) e factor de necrose tumoral beta (TNF- β), que estão envolvidos na imunidade celular. Estas citocinas são responsáveis pelas reacções de hipersensibilidade retardada e pela activação de macrófagos. Os linfócitos T_H2 produzem várias citocinas, entre elas a interleucina-4 (IL-4), a interleucina-5 (IL-5) e a interleucina-10 (IL-10), envolvidas na imunidade humoral. Os

linfócitos T_H2 auxiliam os linfócitos B na resposta com anticorpos e na defesa contra helmintos. Os linfócitos T_H0 são células indiferenciadas precursoras dos linfócitos T_H1 e T_H2 . Os linfócitos $T\ CD8^+$ são activados por um processo complexo que envolve pelo menos três tipos de sinais. Estas células ligam-se através de receptores proteicos a complexos antigénio-MHC-I da superfície de células infectadas por vírus. Para que estes linfócitos se multipliquem e diferenciem, dando origem a linfócitos citotóxicos activos capazes de atacar células infectadas por vírus, têm de ser novamente expostos à IL-2 produzida pelos linfócitos T_H1 . Os linfócitos $CD8^+$ e T_H1 libertam citocinas como o IFN- γ e tanto os macrófagos como os linfócitos T libertam o factor de necrose tumoral alfa (TNF- α). Estas citocinas limitam a multiplicação dos vírus, e activam macrófagos e outras células fagocíticas que destroem células infectadas (Prescott, et al., 2005).

Os linfócitos $T\ CD8^+$ podem destruir células-alvo, como células infectadas por vírus, pelo menos de duas formas: uma delas é mediada pelo CD95, um receptor de membrana da proteína Fas que conduz à apoptose; na outra, perforinas e granzimas produzidas pelos linfócitos $CD8^+$ induzem citólise osmótica e apoptose (Prescott, et al., 2005).

Apesar de não haver provas definitivas, grande parte dos imunologistas considera a existência de linfócitos T-supressores (T_s), capazes de suprimir as respostas lideradas pelos linfócitos B e linfócitos T. A IL-2, produzida por linfócitos T_{Helper} activados, pode estimular a proliferação de subpopulações linfócitos T_s específicas para determinado antigénio. Esta proliferação ocorre a um ritmo lento de modo a permitir um controlo do *feedback* negativo da fracção da resposta imunitária conhecida como tolerância imunitária (Prescott, et al., 2005).

1.5.3. Resposta imunitária a infecções virais

A resistência a infecções virais envolve a imunidade humoral, a sensibilização das células do hospedeiro pelo interferão e a imunidade mediada por células (Prescott, et al., 2005).

Os anticorpos têm a capacidade de neutralizar os vírus ligando-se a estes interferindo assim com a sua capacidade de adsorção e entrada nas células do hospedeiro. As imunoglobulinas também estimulam a fagocitose e a destruição dos vírus de forma semelhante ao que fazem com as bactérias. O interferão também desempenha um papel importante na resistência aos vírus invasores. As células do hospedeiro, quando estimuladas pelo interferão interrompem a síntese proteica e destroem o ARN mensageiro (ARNm) viral. Alguns tipos de interferão têm a capacidade de estimular a actividade das células T e células *Natural Killer*, acelerando assim a resposta imunitária às infecções virais. A resposta imunitária mediada por células possui um mecanismo complexo de resistência a vírus com envelope quando estes modificam a membrana celular das células do hospedeiro (ex.: vírus da raiva). Os linfócitos activados conseguem reconhecer e destruir as células infectadas por vírus devido à alteração da sua membrana celular. Os linfócitos T citotóxicos destroem as células infectadas por vírus através da FasL (citocina da família do factor de

necrose tumoral TNF- α com a capacidade de induzir a apoptose), produção de granzimas e perforinas que formam canais na membrana das células infectadas pelo vírus provocando citólise e apoptose. As proteínas do MHC-I estão envolvidas no reconhecimento, pelas células T, de células infectadas. As células que exibam antígenos virais e MHC-I característicos serão destruídas (Prescott, et al., 2005).

As células *Natural killer* (NK) também são capazes de destruir células infectadas por vírus e a sua actividade é estimulada pelo interferão e pelos anticorpos (Prescott, et al., 2005).

1.5.4. Imunossupressão e quimioterapia

A imunossupressão pode ser definida como “ a inibição de um ou mais elementos da imunidade inata ou adquirida, como resultado de uma doença subjacente ou induzida intencionalmente através da utilização de fármacos com o objectivo de prevenir ou tratar a rejeição de enxertos ou doenças autoimunes. Um dos fármacos imunossupressores mais utilizado é a ciclosporina que bloqueia a produção de citocinas pelas células T” (Abbas & Lichtman, 2005, p.490, tradução livre).

Em Medicina Humana, a questão da imunossupressão associada à quimioterapia começou a ser avaliada há várias décadas e existem numerosos artigos publicados que analisam este tema.

Ainda na década de 70 foi publicado um artigo (Feldman, Hughes, & Daniel, 1975) em que era demonstrado que crianças com cancro que anteriormente tinham sido infectados pelo vírus da varicela-zoster, eram susceptíveis ao desenvolvimento da varicela devido à própria doença neoplásica ou ao tratamento a que foram sujeitas.

Numa outra publicação do mesmo autor (Feldman, Gigliotti, Bockhold & Naegele, 1988), 115 crianças vacinadas, com diferentes tipos de neoplasias foram avaliadas quanto à presença de anticorpos para sarampo e para rubéola, durante e após a quimioterapia. Uma proporção de 18% das crianças eram seronegativas para o sarampo e 8% seronegativas para a rubéola. Das 9 crianças seronegativas após a quimioterapia, 5 delas eram seropositivas antes do início do tratamento.

Na década de 80 foi realizado um estudo (Rasmussen & Arvin, 1982) no qual foram avaliados vários parâmetros da resposta imunitária em grupos diferentes de indivíduos: um grupo com linfoma de *Hodgkin* e outros tumores linfóides e um grupo de pacientes sujeitos a transplante cardíaco. Ambos os grupos realizaram tratamento imunossupressor com quimioterapia e radioterapia.

O herpes zoster, provocado pelo vírus zoster, é um problema recorrente e por vezes grave, que afecta os doentes com linfoma de *Hodgkin* que efectuam terapêutica imunossupressora. A incidência do herpes zoster é maior nos doentes com linfoma de *Hodgkin* do que nos pacientes com tumores sólidos. Existem várias características imunológicas que podem predispor ao desenvolvimento de herpes zoster em doentes com linfoma de *Hodgkin*, tais como perda da hipersensibilidade do tipo IV (mediada por células ou do tipo retardado) e diminuição da capacidade de iniciar novos processos de hipersensibilidade. Por vezes verifica-se linfopénia, mas a produção de anticorpos é quase sempre normal (só se encontra comprometida em fases avançadas da doença).

Na população de doentes com herpes zoster existem dois problemas específicos provavelmente relacionados com uma imunidade celular deficiente: primeiro um aumento do risco inicial da doença provocada pelo vírus zoster e segundo, após a ocorrência da doença, um aumento da frequência da sua disseminação pelo organismo.

As respostas *in vitro* dos linfócitos ao vírus zoster em pacientes com linfoma (não tratados ou em remissão) foram comparadas com aquelas de indivíduos saudáveis. Tanto a resposta dos linfócitos como a produção de interferão, após exposição ao vírus zoster, foram mais fracas nos indivíduos com linfoma que não estavam a fazer tratamento do que nos indivíduos com linfoma em remissão e do que nos indivíduos saudáveis.

Foi avaliado em 86 indivíduos com linfoma a função dos linfócitos após 16 meses de tratamento. Metade dos casos de herpes zoster ocorreu em pacientes sujeitos a quimioterapia e radioterapia. Nesses mesmos indivíduos foi detectada uma anomalia na diferenciação dos linfócitos após o contacto com o vírus zoster. As respostas a mitogénios não-específicos e o número de linfócitos T normalizaram antes de normalizarem as respostas a mitogénios específicos como o vírus herpes.

No grupo de indivíduos submetidos a transplante cardíaco, as infecções por citomegalovírus (herpes-vírus) foram muito frequentes. Nestes indivíduos, problemas com a diferenciação dos linfócitos e com a produção de interferão estão presentes no período de maior susceptibilidade ao citomegalovírus, situação semelhante à encontrada nos pacientes com linfoma em relação à susceptibilidade ao herpes zoster.

Em indivíduos tratados com doses elevadas de quimioterapia imunossupressora, a doença provocada pelo herpes zoster prolongou-se por períodos até 6 meses, numa situação que costuma ser autolimitante. Quando a dose dos fármacos utilizados era diminuída tinha início a resolução das lesões e era interrompida a propagação pelo organismo do paciente. Esta forma mais prolongada da doença poderá estar relacionada com a depressão da imunidade celular nestes indivíduos dado que a depleção dos linfócitos T era um dos objectivos do tratamento.

Noutra publicação (Locasciulli, Santamaria, Maserà, Schiavon, Alberti, & Realdi, 1985) foi avaliada a presença de anticorpos para o vírus da Hepatite B em 49 crianças com leucemia aguda que estavam a ser submetidas a tratamento quimioterápico. Antes do início do tratamento 8 delas eram seropositivas para a Hepatite B, todas elas se tornaram seronegativas após 3 meses de tratamento.

Num outro estudo feito em crianças com leucemia linfobástica aguda (Alanko, Pelhiemi, & Salmi, 1992) foram realizadas contagens de leucócitos, contagens diferenciais de leucócitos, linfócitos B e imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) aos 0, 1, 3, 6, 9 e 12 meses após o final da quimioterapia. Os números de leucócitos e linfócitos encontravam-se abaixo dos valores de referência no momento de interrupção da quimioterapia (60% abaixo do limite inferior). Um ano depois da interrupção da quimioterapia apenas um dos indivíduos não tinha os valores de leucócitos e linfócitos normalizados.

Apesar de haver uma recuperação rápida dos valores dos linfócitos B, os níveis de imunoglobulinas, que reflectem a função dos linfócitos B, recuperaram mais lentamente. Durante o período de realização do estudo foram diagnosticados diferentes tipos de

infecções na maioria dos indivíduos, tais como infecções do aparelho respiratório superior, otites, gastroenterites e ainda quatro casos de varicela.

A imunossupressão provocada pela quimioterapia levou a um aumento da vulnerabilidade a infecções e a restrições na vida quotidiana. De modo a diminuir a susceptibilidade a infecções foram utilizados antibióticos e imunizações de forma profilática. Seis meses após a conclusão da quimioterapia, o número de episódios infecciosos não diminuiu. Isto poderá ter acontecido porque houve um aumento do contacto com agentes potencialmente infecciosos e a administração de antibióticos foi interrompida. Estudos anteriores a este demonstraram que a imunização com vacinas inactivadas durante a administração de quimioterapia é segura mas de eficácia questionável. Neste estudo verificou-se que 6 meses após a quimioterapia ter terminado os valores dos linfócitos B e das imunoglobulinas se encontrava normalizado, ou seja, o sistema imunitário desse ponto de vista encontrava-se de novo operacional. Assim o protocolo utilizado e que prevê a interrupção da antibioterapia e início da vacinação 6 meses depois de acabar a quimioterapia está de acordo com os resultados obtidos.

Noutro estudo realizado em crianças com leucemia linfoblástica aguda (Komada et al., 1992) foram avaliados os efeitos imunossupressores da quimioterapia. O tratamento incluiu a administração de 6-mercaptopurina (diariamente) e metotrexato (semanalmente) combinados com um tratamento de consolidação a cada 3 meses com vincristina, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina e prednisona. Foram feitas colheitas de sangue em diferentes momentos do tratamento; nos dias de administração de ciclofosfamida e duas semanas após o tratamento de consolidação. Antes do início do tratamento de consolidação os números de linfócitos T CD3⁺, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, linfócitos B CD19⁺, e células NK (CD3⁺/CD16⁺) eram muito menores que os dos indivíduos saudáveis do grupo controlo. Apesar disto o rácio entre o número de linfócitos CD4⁺/CD8⁺ e a percentagem de linfócitos no sangue periférico era muito semelhante nos indivíduos com leucemia e nos indivíduos saudáveis. Neste caso ficou provado que a administração de fármacos citostáticos pode provocar alterações na citotoxicidade mediada por células, na produção de citoquinas, no número de linfócitos e fenótipos dos linfócitos no total de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC). Os pacientes com leucemia apresentavam deficiências graves na produção de IL-2 e na citotoxicidade mediada por células NK após o tratamento de consolidação. Por outro lado, a produção de TNF- α e a actividade contra células-alvo resistentes às células NK encontrava-se melhorada. A prednisona e a 6-mercaptopurina são conhecidas por interferir no sistema da IL-2, por diminuir a produção da mesma e por diminuir a síntese de ARNm de IL-2. Além disso provocam a diminuição do número de linfócitos T e sub-populações de linfócitos T levando assim à diminuição da quantidade de células produtoras de IL-2. Neste estudo, após o tratamento de consolidação, houve uma diminuição da percentagem de linfócitos T CD4⁺ muito acentuada e um aumento da

percentagem de linfócitos T CD8⁺ (apesar do número absoluto de linfócitos T permanecer bastante baixo tanto antes como após o tratamento de consolidação). Após o tratamento de consolidação verificou-se uma diminuição da actividade das células NK devido à diminuição do seu número. Comparando a sua quantidade nos indivíduos com leucemia com que indivíduos saudáveis apresentavam verificou-se que esta era muito semelhante, logo a menor actividade deve-se não só a um menor número das células NK como também à inibição da função das existentes. A quantidade de monócitos e a produção de TNF- α encontravam-se aumentadas de forma semelhante indicando que o aumento de produção do TNF- α se deveria ao aumento do número de monócitos.

Em 1994 foi avaliada por Mackall a depleção de linfócitos em pacientes sujeitos a quimioterapia intensiva. Os autores verificaram que a administração de doses elevadas de citotóxicos levava à depleção do número de linfócitos em indivíduos jovens. O valor médio de linfócitos CD4⁺ foi de 105/mm³ valor que determina uma maior susceptibilidade a infecções. A variação no número total de linfócitos dependeu do protocolo utilizado. Ocorreram várias doenças oportunistas devido à imunossupressão existente, entre elas: pneumonia, herpes zoster e herpes simplex (Mackall et al., 1994).

Mackall (1999) avaliou a imunodeficiência em linfócitos T posteriormente ao tratamento com fármacos citotóxicos em pacientes com diferentes tipos de neoplasias. Antes do início da quimioterapia, indivíduos com diferentes tipos de neoplasias já apresentavam graus variáveis de imunossupressão. A imunossupressão era mais marcada nos casos de leucemia e outras doenças associadas à pancitopénia. Esta condição pré-existente era exacerbada pela quimioterapia prolongada em conjunto, ou não, com a administração de corticosteróides. Os pacientes com linfoma de *Hodgkin* apresentavam comprometimento da diferenciação dos linfócitos para vários antigénios e os pacientes com linfoma de *Burkitt* tinham depleção leucocitária proporcional ao estadió da doença. Nos indivíduos com sarcoma verificou-se uma diminuição dos linfócitos T no sangue periférico. Após o tratamento com citotóxicos surgiram muitas vezes infecções oportunistas e complicações devido à deficiência em linfócitos T. Verificou-se que as doses dos fármacos utilizadas nos protocolos de associação no tratamento de linfoma e tumores sólidos, tiveram influência na incidência de pneumonia (independentemente do estadió do tumor ou da classificação histopatológica). Os protocolos que utilizavam doses elevadas de citotóxicos foram também responsáveis por uma maior depleção dos linfócitos T CD4⁺ do que de T CD8⁺ e pela diminuição do rácio CD4⁺/CD8⁺, sendo assim justificativo para a ocorrência de infecções oportunistas por diminuição dos linfócitos T CD4⁺. Segundo os autores a quimioterapia induz preferencialmente depleção dos linfócitos T *naïve* (CD45RA⁺)CD4⁺. Estas células apresentam um ciclo celular mais lento que as células de memória, os linfócitos T (CD45RO⁺)CD4⁺, sugerindo que o efeito citotóxico dos fármacos utilizados pode não estar dependente do ciclo celular. Os protocolos de associação de fármacos em doses elevadas

provocaram diminuições ligeiras das IgG e diminuições significativas das IgM e das IgA. Por outro lado as células NK parecem ser bastante resistentes à quimioterapia servindo assim como segunda linha de defesa contra agentes patogénicos virais. Verificou-se ainda que existia uma preponderância dos linfócitos T activos os mesmo que *in vitro* apresentam uma maior susceptibilidade à apoptose induzida por mitogénios, podendo este facto limitar a resposta a antígenos *in vivo*. Outra das consequências da quimioterapia, a restrição na variedade de TCR limita a competência imunitária em indivíduos em que regeneração dos linfócitos T ocorre predominantemente através da via de expansão periférica independente do timo. Os pacientes oncológicos apresentam à partida diferentes graus de imunossupressão, pelo que serão os fármacos citotóxicos administrados e a dose desses mesmos fármacos que vão determinar o risco de complicações oportunistas. A depleção dos linfócitos T CD4⁺ induzida pela quimioterapia é independente da idade e relacionada com a intensidade do tratamento. Mas, por outro lado, a capacidade de recuperar as populações dessas mesmas células está intimamente ligada a idade, pelo menos em jovens adultos. Em pacientes mais velhos há uma depleção persistente dos linfócitos CD4⁺, provavelmente devido à diminuição gradual da massa do timo que ocorre, no caso dos humanos, nas duas primeiras décadas de vida. Assim nas crianças, após a conclusão da quimioterapia a imunossupressão verifica-se durante um curto período de tempo ao contrário dos adultos em que tal acontece durante um período mais prolongado. Conclui-se também que a reimunização após quimioterapia em doses elevadas só devia ser feita entre 6 a 12 meses após a conclusão da mesma (recomenda-se em pacientes com depleção profunda dos linfócitos T) e que devem ser utilizadas preferencialmente vacinas mortas ou então vacinas bacterianas ou virais vivas atenuadas apenas 24 meses após a conclusão da quimioterapia. Numa publicação mais recente (Kovacs et al., 2008) foi avaliado o estatuto imunitário de crianças com diferentes neoplasias um ano após quimioterapia intensiva. Das crianças com leucemia e das crianças com tumores sólidos, 53,5% e 28,9% respectivamente, apresentavam alguma alteração dos parâmetros imunológicos. Após um ano as contagens de leucócitos estavam normais ou ligeiramente diminuídas; não foram detectadas linfopenia ou granulocitopenia graves; não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os pacientes com leucemia e os pacientes com tumores sólidos. Das crianças com leucemia oito apresentavam diminuição dos valores de um ou mais tipos de imunoglobulinas (IgG e/ou IgA e/ou IgM). Das crianças com tumores sólidos apenas quatro crianças apresentavam alterações dos valores das imunoglobulinas, duas com diminuições das IgA e duas com diminuições das IgM. Em termos de imunidade celular, os pacientes com leucemia demonstraram um maior número de parâmetros alterados do que os pacientes com tumores sólidos. Esta diferença encontrada foi significativa o que indica que provavelmente o tratamento da leucemia conduz a uma imunossupressão mais profunda.

Também se verificou uma diferença no número de infecções que foi maior nos pacientes com leucemia do que naqueles com tumores sólidos.

A quimioterapia utilizada no tratamento de cães com doenças neoplásicas é muitas vezes indicada como causadora de depressão do sistema imunitário ou imunossupressão. Na verdade até à data foram realizados poucos estudos que nos possam levar a tal conclusão.

Em 2001 foi publicado um estudo (Henry et al., 2001) no qual os autores avaliaram em cães com diferentes neoplasias, antes e após o tratamento com quimioterapia, os títulos de anticorpos contra 3 vírus que provocam doença nos cães, o vírus da esgana, o parvovírus canino e o vírus da raiva. Os títulos de anticorpos para os mesmos 3 vírus foram também avaliados em cães saudáveis apresentados à consulta para revacinação. Os animais estavam divididos em 2 estudos. Do estudo A faziam parte 21 cães com diferentes tipos de neoplasias incluindo linfoma, carcinoma mamário, carcinoma das células de transição da bexiga, hemangioperocitoma, entre outras. De acordo com a neoplasia presente foram utilizados diferentes citostáticos, entre eles, doxorrubicina, L-asparaginase (como parte de protocolo de associação de fármacos), mitoxantrona, cisplatina, carboplatina, ciclosporina, vincristina, prednisona e arabinósido de citosina. Foram colhidas duas amostras de soro, uma antes do início do tratamento e outra durante o tratamento. O intervalo entre as duas colheitas variou entre os 30 e os 272 dias. Em 9 dos animais foram colhidas duas amostras de soro após iniciada a quimioterapia. Em 5 destes animais não houve qualquer diferença no título de anticorpos entre a primeira e a segunda amostra. Já em 3 deles o título de anticorpos para o PVC duplicou entre a primeira e a segunda colheita. Noutro o título de anticorpos para o vírus da esgana canina ou *canine distemper virus* (CDV) voltou ao valor mínimo depois de ter diminuído para metade, da amostra pré-tratamento para a primeira amostra pós-tratamento. Os títulos de anticorpos para o PVC permaneceram inalterados em 52% dos animais e os restantes sofreram diferentes alterações; duplicação do título de anticorpos em 19%, e quadruplicação em 14%; diminuição do título de anticorpos para metade em 10% e para um quarto, num animal.

Em relação aos títulos de anticorpos para CDV, estes permaneceram inalterados em 81% dos animais; diminuíram para metade num cão, e para um quarto em 10% dos cães. Não foi possível fazer nenhuma associação entre o fármaco citotóxico utilizado, o número de dias de intervalo entre as amostras colhidas e o tipo de neoplasia presente, com as alterações dos títulos de anticorpos contra CDV.

Do estudo B faziam parte 16 cães, todos eles com linfoma mas em diferentes estadios (4 no estadio III, 1 no estadio IV e 11 no estadio V). Todos os animais realizaram um protocolo de associação de fármacos padrão, de 24 semanas. Dez deles precisaram de tratamento com L-asparaginase de modo a induzir ou manter a remissão do tumor nos primeiros 6 meses de tratamento. Foram colhidas amostras de soro antes do início do tratamento e nas semanas 5, 8 e 24 do tratamento. Antes de iniciar a quimioterapia, 10 dos animais apresentavam

títulos protectores de anticorpos para CDV e 6 não. Após a conclusão da quimioterapia, 5 cães apresentavam títulos de IgG não protectores para CDV e 11 apresentavam títulos de IgG protectores. Desses animais os valores diminuíram em 2, mantiveram-se em 2 e aumentaram em 3. Em relação aos anticorpos para o PVC, 9 cães antes da quimioterapia e 6 após a quimioterapia possuíam títulos protectores. Três cães tiveram uma diminuição do título de anticorpos de 1:50 para 1:10 e 6 apresentaram títulos baixos que assim se mantiveram. Os títulos de anticorpos para a raiva, antes da quimioterapia, eram protectores em 13 dos 16 animais; mantiveram-se abaixo do nível protector em 2 animais; aumentaram para valores acima do título protector em 2 animais e diminuíram para valores menores que o título protector em 2 animais.

Não foram encontradas variações significativas nos valores de anticorpos para raiva, CDV ou PVC entre as semanas 5, 8 e 24 da quimioterapia. Os resultados obtidos sugeriram que a imunidade humoral existente nestes animais foi suficiente para a manutenção dos títulos de anticorpos vacinais e talvez para a manutenção de uma resposta capaz à exposição natural. Também não foi encontrada nenhuma variação significativa nos valores mínimos de anticorpos entre os cães saudáveis apresentados à consulta e os cães que apresentavam neoplasias. Ao contrário do que seria suposto não foi encontrada qualquer prova de supressão da resposta humoral específica a agentes patogénicos virais no início ou após quimioterapia em cães com diferentes neoplasias.

Em 2002 foi publicado um estudo no qual foram avaliados por citometria de fluxo, os valores de diferentes sub-populações de linfócitos circulantes em cães antes e durante a quimioterapia (Winnicka, Jagielski, Hoffmann-Jagielska & Lechowski, 2002). Neste estudo foram utilizados dois grupos de animais, 20 cães com linfoma multicêntrico e um grupo controlo de cães saudáveis. Nos cães com linfoma os valores dos linfócitos T CD5⁺, CD4⁺ e CD8⁺ encontravam-se muito diminuídos comparando com os cães saudáveis. Pelo contrário os valores dos linfócitos B (CD21-*like*+) encontravam-se muito aumentados nos animais com linfoma. O número total de leucócitos estava aumentado nos cães com linfoma antes do tratamento, sendo que a percentagem de linfócitos B estava aumentada e a percentagem de linfócitos T diminuída. Após a quimioterapia a situação inverteu-se, houve uma diminuição do número total de leucócitos, com uma menor proporção de linfócitos B e uma maior proporção de linfócitos T. Em cães com linfoma, antes do tratamento, o número de linfócitos T_{Helper} era maior que o de linfócitos T citotóxicos comparando com cães saudáveis e cães com linfoma após o tratamento.

Ao longo da quimioterapia os valores e percentagens de linfócitos CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺ e CD21-*like*+ normalizaram.

Num estudo recente, realizado em cães com linfoma submetidos a 2 meses de quimioterapia, foi demonstrado que os animais apresentavam no final do tratamento uma concentração de linfócitos circulantes mais baixa que cães saudáveis e que 14 das 20 sub-

populações de linfócitos se encontravam diminuídas, ou por diminuição da produção ou por diminuição número de linfócitos em circulação (Gauthier, Aubert, Abrahms-Ogg, Woods & Bienzle, 2005). Neste caso não foi possível concluir se se tratou de uma consequência do tratamento, pois estes valores não foram avaliados antes de se iniciar o tratamento, logo as alterações verificadas nas sub-populações de linfócitos podem dever-se ao próprio linfoma e não ao tratamento com fármacos citotóxicos.

Também no estudo de Walter, Biller, Lana, Bachand & Dow, (2006) foram avaliados os efeitos da quimioterapia na imunidade adquirida em cães. Os animais estavam divididos em 3 grupos, 12 animais em que o fármaco usado foi a doxorrubicina (9 com osteossarcoma e 3 com linfoma), 9 animais em que o protocolo utilizado foi o CHOP (todos com linfoma) e um grupo controlo de 8 animais saudáveis. Os animais dos 3 grupos apresentavam uma idade mediana aproximada, sendo que no caso dos cães com neoplasias esta era de 8 anos e no caso dos cães saudáveis esta era de 9 anos. Foi realizada análise serológica e de vários tipos de linfócitos antes do início do tratamento, na primeira e terceira semanas e no terceiro e sexto mês de tratamento. Tanto os cães com linfoma, como os cães com osteossarcoma apresentavam um número total de linfócitos mais baixo que os do grupo controlo. O mesmo acontecia com a população de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. Os valores destas duas sub-populações de linfócitos eram muito semelhantes nos animais com osteossarcoma e nos animais com linfoma antes do início do tratamento. O número de linfócitos B não apresentava grandes diferenças entre os animais com linfoma e os animais saudáveis, e entre os animais com osteossarcoma e os animais saudáveis, mas era menor nos animais com osteossarcoma do que nos com linfoma.

Nos cães tratados com doxorrubicina não foram observadas alterações significativas nos valores dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ durante e após o tratamento quando comparados com os valores pré-tratamento.

Nos cães tratados com o CHOP, os valores dos linfócitos CD4⁺ não variaram muito durante o tratamento face aos valores anteriores ao tratamento. Os valores dos linfócitos CD8⁺ diminuíram drasticamente uma semana após o primeiro tratamento apesar de terem voltado a subir cerca de uma semana depois.

Os cães tratados apenas com doxorrubicina não apresentaram variações significativas dos valores de linfócitos B após o tratamento. Pelo contrário nos animais tratados com o CHOP houve uma diminuição marcada depois do primeiro tratamento e estes permaneceram baixos durante os 6 meses em que decorreu o estudo.

Em relação à avaliação serológica tanto no grupo controlo de animais saudáveis, como no grupo a fazer tratamento com doxorrubicina e no grupo a fazer tratamento com o CHOP, a resposta vacinal (induzida 24h após a primeira sessão de quimioterapia) foi máxima aos 3 meses pós vacinação e aos 6 meses houve uma diminuição da mesma. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os 3 grupos.

Este estudo permitiu concluir que a ideia presente de que a imunossupressão está associada à quimioterapia pode não acontecer em todas as situações.

São várias as doenças oncológicas dos cães responsáveis por um certo grau de depressão imunitária. A imunodepressão está associada a uma maior susceptibilidade a infecções oportunistas, entre elas infecções virais e bacterianas, e a uma menor capacidade resposta humoral. Sendo a utilização da quimioterapia como tratamento cada vez mais frequente na prática clínica, é muito importante haver capacidade de minimizar os possíveis efeitos imunossupressores dos fármacos citostáticos utilizados, diminuindo a sua dose, interrompendo a sua administração ou mesmo substituindo-os por outros.

O conhecimento existente, e como explanado algo controverso, levou-nos a abordar esta temática tentando trazer mais conhecimento sobre a mesma.

III. TRABALHO EXPERIMENTAL

1. Introdução

Com a melhoria dos cuidados médicos prestados aos animais de companhia, em Medicina Veterinária, assistimos nos últimos anos a um aumento da esperança média de vida e a uma melhoria da qualidade da mesma. Paralelamente é também evidente um aumento significativo da incidência de neoplasias tanto em canídeos como em felídeos. Face a esta realidade, na prática clínica, o médico veterinário tem ao seu dispor vários tipos de tratamentos aos quais pode recorrer. Assim são utilizadas a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia, a imunoterapia, a crioterapia, a fototerapia, entre outras, na tentativa de debelar este tipo de doença, cada vez mais frequente. Infelizmente nem sempre estão acessíveis os meios necessários, mas os tratamentos através da cirurgia e da quimioterapia estão cada vez mais disponíveis em Portugal, embora o custo elevado destes tratamentos seja muitas vezes proibitivo para os proprietários.

Por este conjunto de razões a quimioterapia é cada vez mais utilizada no tratamento de diversos tipos de neoplasias em cães (ex.:linfoma, mastocitoma, carcinoma mamário, carcinoma da tiróide). De modo a conjugar o máximo de efeito curativo com o máximo de bem-estar do animal é necessário conhecer os possíveis efeitos secundários decorrentes do tratamento com fármacos citotóxicos, nomeadamente os efeitos no sistema imunitário.

Assim o objectivo deste trabalho foi avaliar a competência imunitária de canídeos submetidos a quimioterapia. Com esse fim foi seleccionado um conjunto de indicadores: detecção de PVC, hemograma, sinais clínicos apresentados e avaliação dos títulos de anticorpos para o PVC.

A parvovirose canina, doença provocada pelo PVC que afecta uma elevada proporção da população canina, requer uma imunocompetência por parte dos animais. O PVC é um vírus abundante no ambiente, de fácil transmissão e a detecção da sua presença no sangue (plasma e células) e nas fezes dos animais, permite avaliar a presença de virémia, multiplicação do vírus nas células sanguíneas e excreção do vírus, respectivamente.

Em conjunto com a avaliação dos hemogramas e dos sinais clínicos que os animais poderiam demonstrar, foi assumido que assim se poderia avaliar se um animal, naquele momento, era imunocompetente ou não.

De modo a complementar toda esta informação, foram também determinados os títulos de anticorpos para o PVC. Para que fosse possível perceber se esses mesmos títulos seriam considerados normais, ou seja, se eram protectores contra a doença, o título de anticorpos foi também determinado num grupo de animais saudáveis, cuja virémia de PVC também foi avaliada.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

O grupo de animais estudados foi constituído por 9 canídeos que iniciaram tratamento com diferentes protocolos de quimioterapia no Hospital Escolar da FMV em 2011. Estes canídeos podiam ser machos ou fêmeas (inteiros ou castrados), de qualquer idade, de qualquer raça e diagnosticados com qualquer tipo de neoplasia. Para fazer parte deste estudo foi condição essencial nunca ter realizado até então, qualquer tipo de tratamento quimioterápico. A amostra de canídeos foi constituída por 3 fêmeas e 6 machos entre os 2 e os 11 anos de idade, apresentando uma idade média de 7,2 anos. Três dos animais eram de raça indeterminada, 2 golden retriever, 3 labrador retriever e 1 pitbull. Os tumores diagnosticados nestes animais foram linfoma (1 caso), mastocitoma (4 casos), tumor venéreo transmissível (2 casos), melanoma amelanótico (1 caso) e carcinoma da tiróide (1 caso). As amostras foram recolhidas entre Março e Agosto de 2011.

A caracterização quanto à idade, sexo, raça, tipo de tumor, tratamento e estado vacinal dos animais está resumida na tabela 1.

Tabela 1 - Características dos indivíduos doentes.

Número	Nome	Idade (anos)	Sexo (M,F; MC, FC)	Raça	Tipo de tumor	Tratamento	Data 1ª Sessão	Estado Vacinal (PVC)
1	Mia	6	F	Indeterminada	Tumor venéreo transmissível	Vincristina	15/03/2011	Desconhecido
2	Sting	10	MC	Golden retriever	Melanoma amelanótico	Doxorrubicina + Carboplatina	19/04/2011	Última vacinação há mais de 1 ano
3	Guga	11	F	Golden retriever	Mastocitoma	Vimblastina + Prednisolona	10/05/2011	Junho de 2008
4	Tignes	6	M	Labrador retriever	Carcinoma da tiróide	Doxorrubicina	10/05/2011	Última vacinação há mais de 1 ano
5	Sushi	2	F	Labrador retriever	Linfoma	CHOP (Ciclofosfamida + Doxorrubicina + Vincristina + Prednisolona)	24/05/2011	Última vacinação há menos de 1 ano
6	Zeus	7	MC	Pitbull	Mastocitoma	Vimblastina + Prednisolona	07/06/2011	Última vacinação há mais de 1 ano
7	Jox	11	M	Indeterminada	Mastocitoma	Vimblastina + Prednisolona	09/06/2011	Janeiro de 2011
8	Boogie	2	M	Indeterminada	Tumor venéreo transmissível	Vincristina	30/06/2011	Novembro de 2010
9	Tobias	10	M	Labrador retriever	Mastocitoma grau III	Vimblastina + Prednisolona	21/07/2011	Dezembro de 2009

Legenda: M – macho inteiro; F – fêmea inteira; MC – macho castrado; FC – fêmea castrada.

Nota: No anexo 1 apresenta-se em pormenor a história clínica de cada indivíduo.

Foram também colhidas amostras de um grupo controlo de 4 canídeos saudáveis (A a D), cujas características são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 – Características dos indivíduos saudáveis.

Letra	Nome	Idade (anos)	Sexo (M,F; MC, FC)	Raça	Estado Vacinal (PVC)
A	Canza	0,75	F	Leão da rodésia	Maior de 2011
B	Golias	3	MC	Pitbull	Maior de 2011
C	Rabeca	7	FC	Indeterminada	Setembro de 2010
D	Estrela	10	FC	Indeterminada	Última vacinação há mais de 1 ano

Legenda: M – macho inteiro; F – fêmea inteira; MC – macho castrado; FC – fêmea castrada.

2.2. Amostras de trabalho

As amostras foram colhidas com o consentimento dos proprietários e de forma a provocar o mínimo de incómodo ao animal, no dia da primeira sessão de quimioterapia e no dia da terceira sessão de quimioterapia, salvo uma excepção em que a segunda colheita foi efectuada no dia da quarta sessão (por desconhecimento da autora da antecipação da terceira sessão em um dia). O intervalo entre a primeira e terceira sessão de quimioterapia variou entre os 13 e os 43 dias apresentando um valor médio de 22 dias.. Foram colhidas amostras de sangue (1mL para tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para hemograma e 1mL para tubo com EDTA para extracção de ADN) e de fezes (zaragatoa rectal).

As zaragatoas rectais foram congeladas a -20 graus Celcius (°C) e processadas posteriormente.

O sangue com o anticoagulante (EDTA) foi centrifugado (4000xg/10mn) de modo a separar o plasma das células. O plasma (mínimo de 300µL) foi transferido para um tubo *ependorf*.

As amostras de células sanguíneas e de plasma foram sempre manipuladas no próprio dia ou o mais tardar no dia a seguir à colheita. Até serem processadas permaneceram armazenadas a 4°C. No caso do grupo de animais saudáveis foram apenas utilizadas amostras de plasma, para determinação do título de anticorpos para o PVC e para extracção de ADN viral. O processamento das amostras envolveu a extracção de ADN viral da amostra de plasma e da amostra de fezes, extracção de ADN total das células sanguíneas, quantificação de ADN e ARN das amostras por espectrofotometria, a amplificação do ADN extraído (PCR), separação dos productos do PCR por electroforese em gel de agarose, observação do gel no aparelho *Image Master® VDS – Pharmacia Biotech* e amplificação do ARN extraído (*Real-time polymerase chain reaction*). Todas estas operações foram realizadas no laboratório de Virologia da FMV. No laboratório de Virologia do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV) foram efectuadas todas as titulações de anticorpos dos animais em estudo.

Na realização da extracção de ADN viral e total foi utilizado um *kit* comercial (*Qiamp® DNAeasy Blood & Tissue Kit – Qiagen*) de acordo com as instruções do fabricante.

De uma forma simples na extracção de ADN viral, o plasma foi homogeneizado com uma solução de lise e a esta mistura foi adicionada uma protease. Após incubação a 56°C durante 15min, foi adicionado etanol para precipitação dos ácidos nucleicos e o lisado foi aplicado numa coluna de sílica gel para fixação selectiva de ADN desidratado. Após lavagens sucessivas com os tampões fornecidos no *kit*, o ADN foi eluído da membrana por aplicação de 60 microlitros (µl) de tampão hidratante.

Na extracção de ADN total o protocolo seguido foi semelhante embora com algumas diferenças iniciais. As células sanguíneas foram homogeneizadas com um tampão de lise de glóbulos vermelhos e colocadas em gelo durante 15min. De seguida foram centrifugadas a 400 x aceleração da gravidade (g), a 4°C durante 10 min. Foi retirado o sobrenadante, permanecendo o *pellet* celular no *ependorf*. As células foram homogeneizadas com uma solução de lise e foi adicionada proteinase K. De seguida a amostra foi incubada a 56°C durante 10min. A partir daqui os passos seguintes foram idênticos aos descritos anteriormente sendo diferente a quantidade de tampão hidratante utilizado na eluição do ADN (200µl em vez de 60µl).

Em relação às amostras de fezes, estas foram homogeneizadas em 300µl de solução tampão fosfato (*phosphate buffered saline* (PBS)) e de seguida clarificadas por centrifugação a 2000 x g durante 10min. Fez-se a colheita do sobrenadante ao qual foi aplicado o protocolo de extracção de ADN viral mencionado anteriormente.

Após extracção as amostras de ADN e de plasma foram armazenadas a -80°C.

Foi quantificado o ADN e o ARN das amostras através de espectrofotometria de modo a ser possível calcular o volume necessário para que em cada reacção do PCR e do *Real-time PCR* fossem utilizadas quantidades idênticas de ambos.

Com o objectivo de detectar ADN viral de parvovírus canino nas amostras biológicas de ADN previamente extraído foi efectuado um PCR. Foram utilizadas um total de 6 amostras por animal (4 de ADN viral, duas de plasma (V1 e V2) e duas de zaragatoas rectais (Z1 e Z2); duas de ADN total (T1 e T2)). O processo de amplificação incluiu um passo inicial de desnaturação a 94°C durante 10min, 40 ciclos a 94°C/30seg, 50°C/1min e 68°C/1min, seguido de um passo final de extensão a 68°C durante 10min. Foram utilizados dois *primers*, 555F e 555R (Desario et al., 2005) e o tampão de reacção. O fragmento amplificado pelo PCR era constituído por 583 pares de bases (bp).

Os produtos de PCR foram separados por electroforese horizontal em gel de agarose a 2,0%, submerso em TAE, durante aproximadamente 60min e utilizando uma diferença de potencial de 80V. Esta técnica permite separar moléculas de ácidos nucleicos de acordo com o seu peso molecular, assim as moléculas maiores migram mais lentamente no gel do que moléculas mais pequenas.

O gel resultante foi de seguida analisado utilizando o aparelho Image Master® VDS – Pharmacia Biotech.

O ADN (canídeos 1 a 9 e canídeos A a D) e ARN (canídeos 1 a 7) foram posteriormente quantificados por espectrofotometria.

Foi também realizado um *Real-time* PCR com o objectivo de detectar ARN de Coronavírus. Para detectar o vírus foram utilizados um par de *primers* e uma sonda *Taqman*® calculados através do software *Primer Express* (*Applied Biosystems*), com base na sequência nucleotídica de 177bp incluída na região 3' UTR do coronavírus felino (*FCoV*) (Herrewegh, de Groot, Cepica, Egberink, Horzinek & Rottier, 1995), previamente clonada no vector plasmídico *pGEM* (Duarte & Tavares, 2007). A reacção foi efectuada num volume total de 20 µl, com 3 micromoles (µM) de *forward primer*, 9 µM de *reverse primer*, 2.5 µM de sonda *Taqman*® e 10 nanogramas (ng) de ARN viral no termociclador *Real-time 7300* (*Applied Biosystems*).

Para a determinação dos títulos de anticorpos foi utilizado um *kit* de *Elisa* indirecto (Ingezim Parvo Canino 15.CPV.K1®). Nesta técnica é utilizado um suporte sólido, (uma placa de polistireno), ao qual foi previamente fixado o antigénio, neste caso proteínas do parvovirus canino. A amostra teste (soro ou plasma) é depois adicionada e incubada. No caso de esta conter anticorpos específicos contra o vírus estes ligam-se ao antigénio da placa. Segue-se depois uma fase de lavagem, de modo a eliminar todo o material não ligado ao antigénio da placa. Depois é acrescentado um anticorpo secundário (uma imunoglobulina antiespécie ligada a uma enzima, conjugado, que detecta o complexo antigénio/anticorpo primário), seguido de incubação. Após lavagem adiciona-se o substrato cromogénico e ocorre uma reacção colorimétrica, que é medida por espectrofotometria num comprimento de onda de 450 nm. A presença de cor indica a presença de anticorpos contra o parvovirus e a ausência de cor indica a ausência de anticorpos contra parvovirus. Esta metodologia permite fazer a quantificação dos títulos de anticorpos. Inicialmente a determinação do título de anticorpos de cada amostra foi realizada utilizando uma diluição de 1/100 da mesma, como indicado pelas instruções do *kit*, de forma a fazer um rastreio de anticorpos para o PVC. A partir do resultado (título de anticorpos calculado a partir do valor da absorvância utilizando a fórmula fornecida pelo *kit*), o procedimento foi repetido para novas diluições da amostra, duas ou três, escolhendo uma diluição abaixo e acima e nalgumas situações uma terceira praticamente coincidente com o resultado obtido para a diluição de 1/100. Por exemplo, se no caso da diluição de 1/100 o resultado obtido fosse de 1650 aproximadamente, repetir-se-ia o protocolo para a diluição 1/800, para a diluição de 1/1600 e para a diluição de 1/3200.

2.3. Análise estatística

De modo a permitir uma análise mais quantitativa dos resultados foi realizado um estudo estatístico dos mesmos, ciente do número reduzido da amostra de indivíduos submetidos a quimioterapia (9) e de indivíduos saudáveis (4).

Para determinar se existiria alguma relação entre as alterações do hemograma e o tratamento quimioterápico foi realizada uma análise estatística com base no *Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test*. É um teste não paramétrico: adequado a amostras pequenas e para o qual não é necessário que a variável analisada tenha uma distribuição normal. Este teste estatístico permite comparar distribuições (mais frequentemente, as medianas) de duas populações que são iguais em tudo excepto na variável em estudo. Por exemplo, no nosso caso comparámos o número mediano de leucócitos na população de canídeos antes de começar a quimioterapia com o número mediano de leucócitos na população de canídeos após duas sessões de quimioterapia. O teste foi baseado na seguinte hipótese nula (H_0): a mediana dos valores de cada um dos parâmetros avaliados através do hemograma dos animais submetidos a quimioterapia antes de iniciarem o tratamento (1ª sessão) e após o tratamento (3ª sessão) é igual. Foi efectuado um teste para cada um dos parâmetros. Estes testes foram realizados com o auxílio do *software GraphPad InStat* e o seu relatório completo pode ser consultado no anexo 6.

Foi também realizada a análise estatística dos títulos de anticorpos para o PVC dos animais submetidos a quimioterapia e dos títulos de anticorpos para o PVC de um grupo controlo de animais saudáveis. Para facilitar esta tarefa, visto que nalguns dos exemplos os títulos de anticorpos eram apresentados como um intervalo de valores, o título seleccionado foi sempre o último para o qual o teste foi considerado positivo. Assim se o título de anticorpos fosse $\geq 1/400 < 1/1600$, o título considerado seria 1/400. Para além disso as fracções que indicavam o título de anticorpos foram substituídas pelas formas decimais correspondentes.

Na análise estatística usaram-se os seguintes testes não paramétricos: o *Mann-Whitney Test* e o *Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test*. O *Mann-Whitney Test* compara medianas de duas populações independentes (das quais temos amostras que não têm que ser necessariamente da mesma dimensão). Na nossa situação, o teste foi aplicado à população de animais que foram submetidos a quimioterapia e à população de animais saudáveis. Estes testes foram realizados com o auxílio do *software GraphPad InStat* e o seu relatório completo pode ser consultado no anexo 6.

Foi avaliada a relação entre os títulos de anticorpos dos animais de quimioterapia antes de iniciarem o tratamento (1ª sessão) e os títulos de anticorpos do grupo controlo de animais saudáveis; foi avaliada a relação entre os títulos de anticorpos dos animais de quimioterapia após duas sessões de tratamento (3ª sessão) e os títulos de anticorpos do grupo controlo de animais saudáveis e ainda a relação dos títulos de anticorpos dos animais submetidos a

quimioterapia antes de iniciarem o tratamento (1ª sessão) e dos títulos de anticorpos dos animais submetidos a quimioterapia após duas sessões de tratamento (3ª sessão).

No primeiro caso o teste foi baseado na seguinte hipótese nula: a mediana dos títulos de anticorpos para o PVC da população de animais submetidos a quimioterapia antes de iniciarem o tratamento (1ª sessão) e a mediana dos títulos de anticorpos para o PVC da população de animais saudáveis do grupo controlo é igual.

No segundo caso o teste foi baseado na seguinte hipótese nula: a mediana dos títulos de anticorpos para o PVC na população de animais submetidos a quimioterapia após duas sessões de tratamento (3ª sessão) e a mediana dos títulos de anticorpos para o PVC na população de animais saudáveis do grupo controlo é igual.

No terceiro caso o teste foi baseado na seguinte hipótese nula: a mediana dos títulos de anticorpos para o PVC na população de animais submetidos a quimioterapia antes de iniciarem o tratamento (1ª sessão) e a mediana dos títulos de anticorpos para o PVC na população de animais submetidos a quimioterapia após duas sessões de tratamento (3ª sessão) é igual.

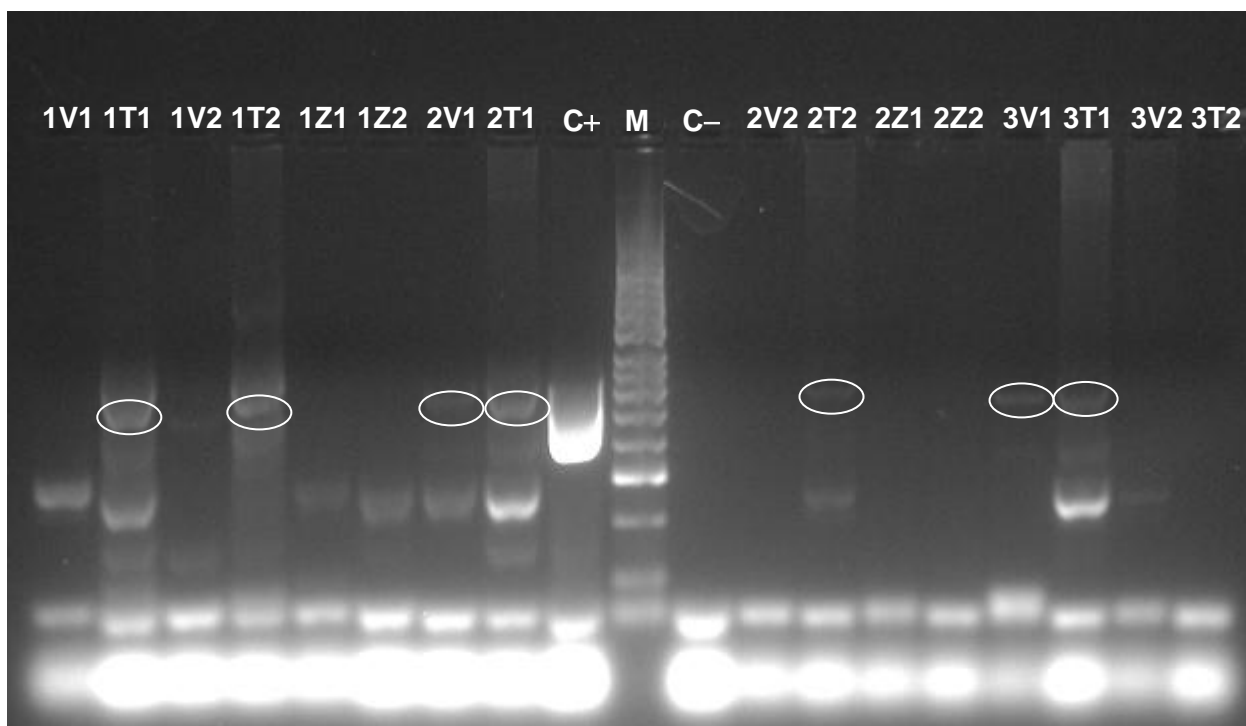
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Detecção do PVC

Os canídeos englobados por este estudo, tanto no ambiente hospitalar, como na rua ou mesmo em casa, têm probabilidade de contactar permanentemente com o PVC através de fomites, animais portadores do vírus e animais doentes.

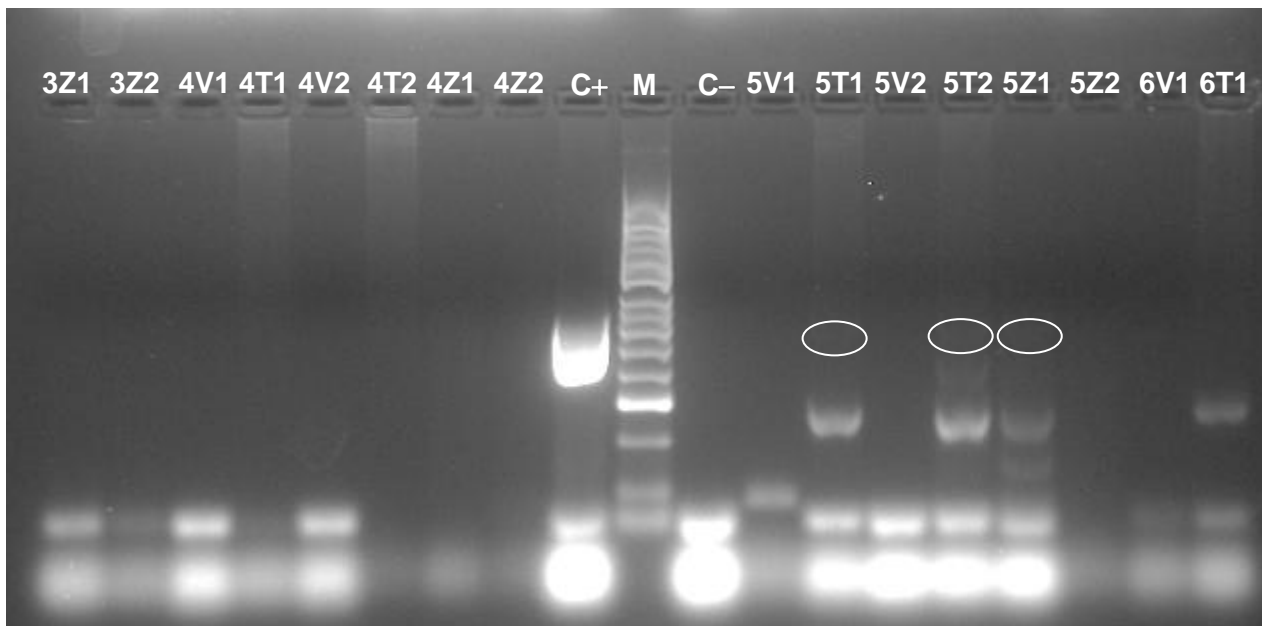
A partir dos resultados foi possível verificar a presença de ADN de PVC num ou mais tipos de amostras recolhidas (células sanguíneas e/ou plasma e/ou fezes) da maioria dos canídeos submetidos a quimioterapia, na primeira e/ou na terceira sessão.

Figura 2, 3, 4 e 5 - Visualização no aparelho *Image Master® VDS – Pharmacia Biotech* do resultado da electroforese em gel de agarose dos produtos obtidos por PCR das amostras dos canídeos submetidos a quimioterapia. Foram utilizadas um total de 6 amostras por animal: 4 de ADN viral que correspondem a duas amostras de plasma (V1 e V2) e duas zaragatoas rectais (Z1 e Z2) e duas amostras de ADN total (T1 e T2). As amostras V1, T1 e Z1 e as amostras V2, T2 e Z2 correspondem às amostras da primeira sessão (antes de iniciar o tratamento) e terceira sessão de quimioterapia, respectivamente. Nas figuras as amostras 1V1, 1T1, 1V2, 1T2, 1Z1 e 1Z2 correspondem às 6 amostras do animal N^o 1 (Mia); as amostras 2V1, 2T1, 2V2, 2T2, 2Z1 e 2Z2 correspondem às 6 amostras do animal N^o 2 (Sting) e assim sucessivamente para os restantes animais.



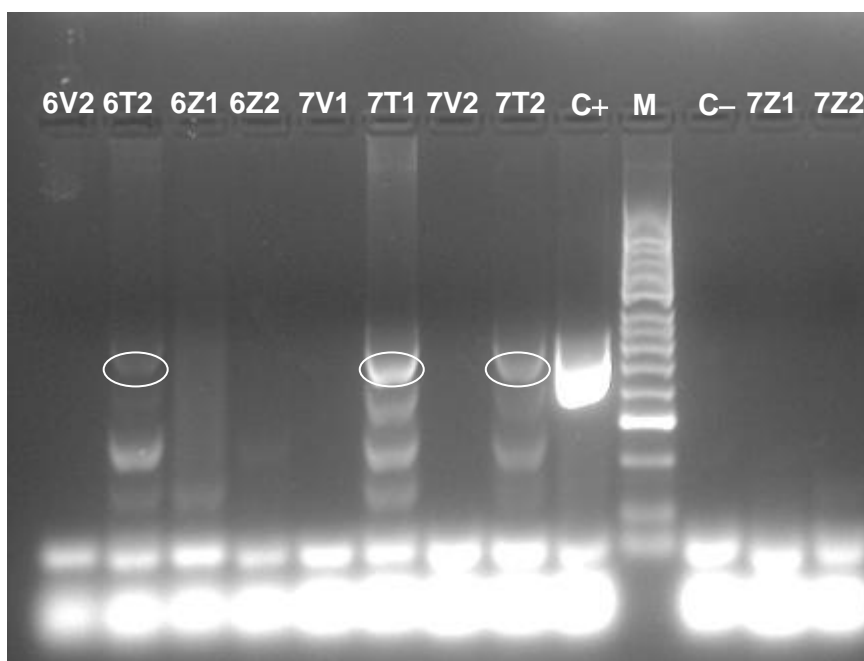
Legenda: 1 – amostras do cão 1; 2 – amostras do cão 2; 3 – amostras do cão 3; C+ – controlo positivo; M – marcador de peso molecular; C - – controlo negativo. 1T1, 1T2, 2V1, 2T1, 2T2, 3V1 e 3T1 positivos para o PVC.

Figura 3 - Visualização no aparelho *Image Master® VDS – Pharmacia Biotech* do resultado da electroforese em gel de agarose dos produtos obtidos por PCR das amostras dos canídeos submetidos a quimioterapia.



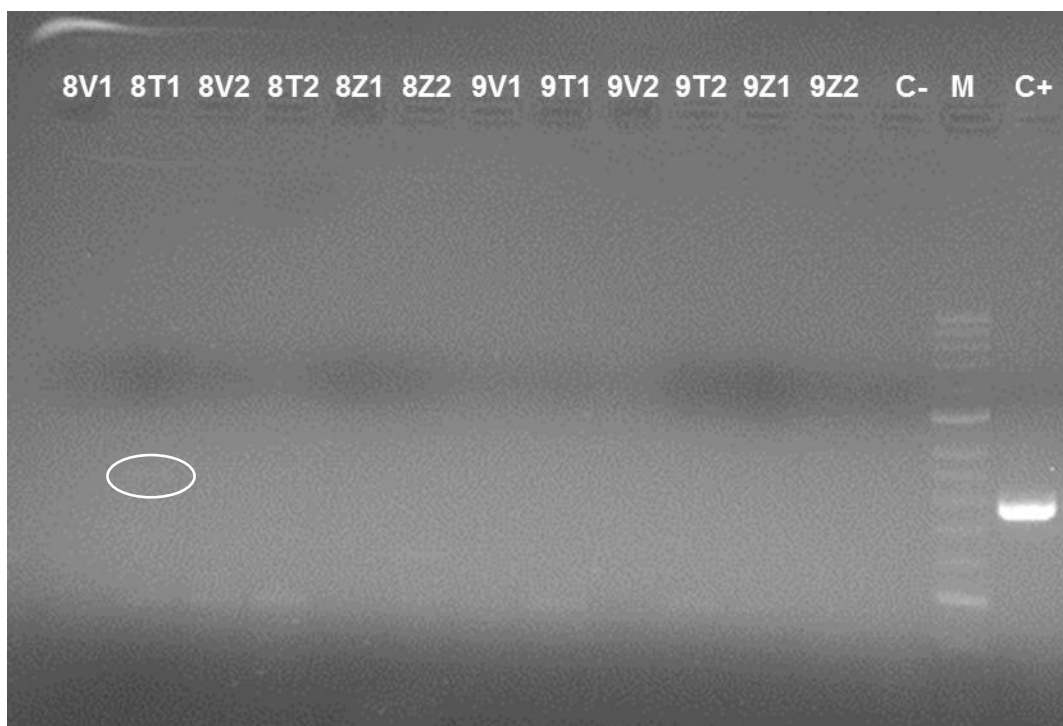
Legenda: 3 – amostras do cão 3; 4 – amostras do cão 4; 5 – amostras do cão 5; 6 – amostras do cão 6; C+ – controlo positivo; M – marcador de peso molecular; C - – controlo negativo. 5T1, 5T2 e 5Z1 positivos vestigiais para o PVC.

Figura 4 - Visualização no aparelho *Image Master® VDS – Pharmacia Biotech* do resultado da electroforese em gel de agarose dos produtos obtidos por PCR das amostras dos canídeos submetidos a quimioterapia.



Legenda: 6 – amostras do cão 6; 7 – amostras do cão 7; C+ – controlo positivo; M – marcador de peso molecular; C - – controlo negativo. 6T2, 7T1, 7T2 positivos para o PVC.

Figura 5 - Visualização no aparelho *Image Master® VDS – Pharmacia Biotech* do resultado da electroforese em gel de agarose dos produtos obtidos por PCR das amostras dos canídeos submetidos a quimioterapia.



Legenda: 8 – amostras do cão 8; 9 – amostras do cão 9; M – marcador de peso molecular; C - – controlo negativo; C+ – controlo positivo. 8T1 positivo vestigial para o PVC.

Tabela 3 – Resumo dos resultados da detecção de PVC nas amostras de plasma, células sanguíneas e fezes dos animais submetidos a quimioterapia.

Animal	Amostra	1ª Sessão			3ª Sessão		
		Plasma	Céls. Sang.	Fezes	Plasma	Céls. Sang.	Fezes
Mia (1)		•	+	•	•	+	•
Sting (2)		+	+	•	•	+	•
Guga (3)		+	+	•	•	•	•
Tignes (4)		•	•	•	•	•	•
Sushi (5)		•	+	+	•	+	•
Zeus (6)		•	•	•	•	+	•
Jox (7)		•	+	•	•	+	•
Boogie (8)		•	+	•	•	•	•
Tobias (9)		•	•	•	•	•	•

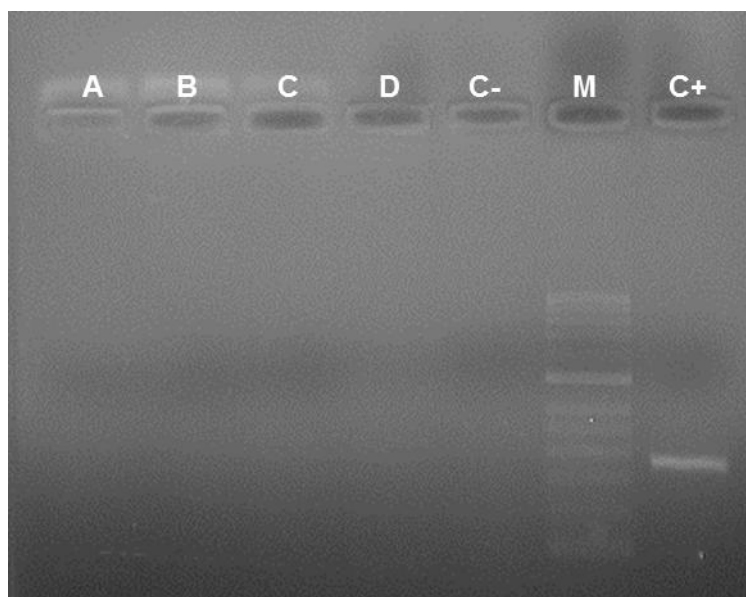
Legenda: +: Positivo para o PVC; •: Negativo para o PVC; +*: Positivo vestigial para o PVC; +**: Positivo vestigial para o PVC.

Nos 2 canídeos em que foi detectado PVC no plasma foi, como era esperado, detectado PVC também nas células sanguíneas (Nº 2, Sting e Nº3, Guga, na primeira sessão). Nestes

2 animais, já não foi possível detectar PVC no plasma recolhido no dia da terceira sessão de quimioterapia, apenas foi detectado PVC nas células sanguíneas do canídeo Nº 2. Nos canídeos Nº 5 (Sushi), e Nº 8 (Boogie), apenas foram detectados vestígios do vírus, não sendo portanto consideradas amostras positivas.

A presença de PVC nas células sanguíneas deve-se ao tropismo especial que este vírus apresenta para os linfócitos e monócitos, replicando-se no núcleo dos mesmos. A presença do vírus no plasma, virémia, é explicada pela passagem do vírus para a circulação sanguínea após a sua replicação no núcleo de diferentes células do organismo, como enterócitos das criptas de Lieberkuhn, células dos órgãos linfóides primários (medula óssea e timo) e secundários (nódulos linfáticos, baço, outros tecidos linfóides) (Parrish, 1995), e também nas células sanguíneas (linfócitos e monócitos). A presença do vírus nas fezes deve-se à eliminação do mesmo, após replicação nos enterócitos das criptas de Lieberkuhn, e destruição das mesmas.

Figura 6 - Visualização no aparelho Image Master® VDS – Pharmacia Biotech do resultado da electroforese em gel de agarose do grupo de cães saudáveis.



Legenda: A, B, C e D – amostras de ADN viral do plasma dos canídeos saudáveis.

2. Detecção do Coronavírus

Quanto à determinação da presença de ARN de coronavírus canino nas amostras, todos os resultados obtidos foram negativos.

3. Hemograma

Neste estudo não foram avaliadas as diferentes sub-populações de linfócitos. Apenas foi possível realizar um hemograma que permite, entre outras coisas, avaliar alterações no número total de leucócitos e nos principais grupos de leucócitos, como os neutrófilos e os linfócitos, através da contagem diferencial de leucócitos

Nas tabelas 4 e 5 são apresentados os resultados dos hemogramas dos animais submetidos a quimioterapia na primeira (antes do início do tratamento) e terceira sessão.

Tabela 4 – Resultados dos hemogramas na primeira sessão de quimioterapia (antes de iniciar o tratamento).

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Parâmetro									
Leu ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	29,5 ↑	8,4	8,46	4,97 ↓	14,0	8,46	9,56	24,9 ↑	8,53
Erit ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	2,7 ↓	5,47	5,91	5,03 ↓	3,11 ↓	6,42	6,54	5,99	7,2
Plaq ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	102 ↓	296	500	348	246	252	372	343	263
Hem (g/dl)	3,24 ↓	13,0	14,7	11,2 ↓	7,57 ↓	15,3	14,6	13,7	16,0
HT (%)	12,6 ↓	35,8 ↓	43,0	32,9 ↓	23,0 ↓	46,8	44,0	41,2	49,5
VCM (fl)	46,7 ↓	66,0	72,8	65,4	74,0	73,0	67,2	68,7	68,8
HCM (pg)	12,0 ↓	23,8	24,9 ↑	22,2	24,3	23,9	22,3	22,8	22,2
CHCM (g/dl)	25,8 ↓	36,4	34,3	33,9	32,9	32,7	33,1	33,2l	32,3
Neut Nseg (μl)	0	6340 $\times 10^3/\text{mm}^3*$	0	0	0	0	0	0	0
Neut seg (μl)	25665 ↑		5922	3181	9800	5499	8508	20418 ↑	6056
Linf (μl)	3245	1570	1438	1392	2940	2030	96 ↓	1245	1791
Mon (μl)	590	130 ↓	1015	199	980	338	669	2490 ↑	682
Eos (μl)	0	270	85	199	280	592	287	747	0
Bas (μl)	0	50	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 5 - Resultados dos hemogramas na terceira sessão de quimioterapia (excepto animal Nº 1, quarta sessão).

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Parâmetro									
Leu ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	6,8	6,98	9,65	4,52 ↓	6,57	5,09 ↓	7,66	13,4	7,63
Erit ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	7,37	5,2 ↓	5,02 ↓	4,75 ↓	3,21 ↓	5,62	5,65	6,17	6,39
Plaq ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	757 ↑	567 ↑	476	430	259	273	356	468	204
Hem (g/dl)	12,9	11,8 ↓	11,9 ↓	10,3 ↓	7,65 ↓	13,6	12,8	14,3	14,3
HT (%)	37,1	35,0 ↓	37,4	30,4 ↓	23,4 ↓	40,4	38,2	42,5	43,6

Tabela 5 (continuação) - Resultados dos hemogramas na terceira sessão de quimioterapia (excepto animal Nº 1, quarta sessão).

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Parâmetro									
VCM (fl)	50,0 ↓	67,2	74,4	64,0	73,1	72,0	67,6	68,9	68,2
HCM (pg)	17,4 ↓	22,7	23,6	21,7	23,8	24,1	22,6	23,2	22,4
CHCM (g/dl)	34,7	33,8	31,7 ↓	33,8	32,6	33,5	33,4	33,6	32,9
Neut Nseg (/μl)	3130**	0	0	0	0	0	0	0	0
Neut seg (/μl)		3420	7527	3435	4928	3105	5592	8844	5494
Linf (/μl)	3120	3071	1448	949	1248	1425	1609	2814	1602
Mon (/μl)	330	489	676	136	329	407	460	1072	534
Eos (/μl)	140	0	0	0	66	153	0	670	0
Bas (/μl)	70	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda (tabelas 4 e 5): Leu: leucócitos; Erit: eritrócitos; Plaq: plaquetas; Hem: hemoglobina; HT: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; Neut Nseg: neutrófilos não segmentados; Neut seg: neutrófilos segmentados; Linf: linfócitos; Mon: monócitos (valores absolutos); Eos: eosinófilos; Bas: basófilos; * - neutrófilos segmentados e neutrófilos não segmentados; ** - neutrófilos segmentados e neutrófilos não segmentados; ↑ - Parâmetro acima dos valores de referência; ↓ - Parâmetro abaixo dos valores de referência.

Foi realizada a análise estatística dos valores dos hemogramas dos animais submetidos a quimioterapia antes de iniciarem o tratamento e após duas sessões de tratamento através do *Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test*. A hipótese nula proposta foi: a mediana dos valores de cada um dos parâmetros avaliados através do hemograma dos animais submetidos a quimioterapia antes de iniciarem o tratamento (1ª sessão) e após o tratamento (3ª sessão) é igual.

Tabela 6 – Resultados obtidos utilizando o *Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test* na avaliação estatística dos hemogramas dos animais submetidos a quimioterapia.

		1ª Sessão	3ª Sessão
Leuc	Min	4.97	5.0
	Máx	29.50	13.40
	Med	8.530	7.0
	p	0.0391	
Erit	Min	2.70	3.210
	Máx	7.20	7.370
	Med	5.910	5.620
	p	0.250	

		1ª Sessão	3ª Sessão
Plaq	Min	102.0	204.0
	Máx	500.0	757.0
	Med	296.0	430.0
	p	0.2031	
Hem	Min	3.240	7.650
	Máx	16.0	14.30
	Med	13.70	12.80
	p	0.250	

Tabela 6 (continuação) – Resultados obtidos utilizando o *Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test* na avaliação estatística dos hemogramas dos animais submetidos a quimioterapia.

		1ª Sessão	3ª Sessão
HT	Min	12.60	23.40
	Máx	49.50	43.60
	Med	41.20	37.40
	p	0.3008	
VCM	Min	46.70	50.0
	Máx	74.0	74.40
	Med	68.70	68.20
	p	0.7344	
HCM	Min	12.0	17.40
	Máx	24.90	24.10
	Med	22.80	22.70
	p	0.7344	
CHCM	Min	25.80	31.70
	Máx	36.40	34.70
	Med	33.10	33.50
	p	0.6523	
Neut Nseg	Min	*	*
	Máx	*	*
	Med	*	*
	p	*	

		1ª Sessão	3ª Sessão
Neut seg	Min	3181.0	3105.0
	Máx	25665	8844.0
	Med	7282.0	5211.0
	p	0.1094	
Linf	Min	96.0	949.0
	Máx	3245.0	3120.0
	Med	1570.0	1602.0
	p	> 0.9999	
Mon	Min	130.0	136.0
	Máx	2490.0	1072.0
	Med	669.0	460.0
	p	0.1289	
Eos	Min	0.0	0.0
	Máx	747.0	670.0
	Med	270.0	0.0
	p	0.0391	
Bas	Min	0.0	0.0
	Máx	50.0	70.0
	Med	0.0	0.0
	p	> 0.9999	

Legenda (tabela 6): Leu: leucócitos; Erit: eritrócitos; Pla: plaquetas; Hem: hemoglobina; HT: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; Neut Nseg: neutrófilos não segmentados; Neut seg: neutrófilos segmentados; Linf: linfócitos; Mon: monócitos (valores absolutos); Eos: eosinófilos; Bas: basófilos; *: não é possível realizar o teste pois todos os valores são iguais a zero; Min: valor mínimo; Máx: valor máximo; Med: mediana; p: valor de p.

A partir do valor de p, é possível rejeitar ou não a H_0 . Se $p < 0,05$ há evidências que permitem rejeitar a H_0 ; se valor de p ($p > 0,05$) não há evidências que permitam rejeitar a H_0 . Na análise estatística do hemograma, $p > 0,05$ para todos os parâmetros excepto os leucócitos e os eosinófilos, em que $p < 0,05$. Para os leucócitos e para os eosinófilos existem evidências que nos permitem rejeitar a H_0 . Para os restantes parâmetros avaliados pelo hemograma não é possível rejeitar a H_0 .

Ora este teste de comparação de medianas permitiu concluir que de todos os parâmetros avaliados pelo hemograma apenas os valores do número total de leucócitos e dos eosinófilos poderão eventualmente ser influenciados pela quimioterapia. Tendo em conta o pequeno número de indivíduos da amostra (apenas 9), de forma a poder confirmar a validade destas hipóteses, seria necessário desenvolver um novo plano experimental com um maior número de indivíduos e uma amostra mais homogénea. Da mesma maneira seria necessário repetir o mesmo processo nas condições atrás referidas, para avaliar se em

canídeos a quimioterapia tem alguma influência ou não nos restantes parâmetros avaliados pelo hemograma.

4. Sinais clínicos

Tabela 7 – Sinais clínicos apresentados pelos cães, na primeira (antes do início do tratamento) e na terceira sessão de quimioterapia.

Número	Nome	Tratamento	Sessão	Sinais clínicos apresentados
1	Mia	Vincristina	1ª	Anemia muito grave, trombocitopénia e leucocitose com neutrofilia
			4ª	Trombocitose
2	Sting	Doxorrubicina + Carboplatina	1ª	Anemia e monocitopénia ligeiras
			3ª	Anemia e trombocitose ligeiras
3	Guga	Vimblastina + Prednisolona	1ª	-
			3ª	Anemia ligeira e diarreia
4	Tignes	Doxorrubicina	1ª	Anemia e leucopénia ligeiras
			3ª	Anemia e leucopénia ligeiras
5	Sushi	CHOP (Ciclofosfamida + Doxorrubicina + Vincristina + Prednisolona)	1ª	Anemia moderada
			3ª	Anemia moderada
6	Zeus	Vimblastina + Prednisolona	1ª	-
			3ª	Leucopénia ligeira
7	Jox	Vimblastina + Prednisolona	1ª	Linfopénia
			3ª	-
8	Boogie	Vincristina	1ª	Leucocitose, neutrofilia e monocitose
			3ª	-
9	Tobias	Vimblastina + Prednisolona	1ª	-
			3ª	-

Nota: No anexo 1 apresenta-se em pormenor a história clínica de cada indivíduo.

Para avaliar se um canídeo era imunocompetente no dia da primeira e no dia da terceira sessão de quimioterapia, poderia ser detectado PVC nas amostras recolhidas mas o animal não poderia demonstrar sinais clínicos de doença associada ao PVC, tais como febre, prostração ou diarreia e também alterações do hemograma como linfopénia e neutropénia. Ou seja, apesar do vírus poder estar presente no organismo do animal, o sistema imunitário desse mesmo animal, incluindo a resposta mediada por anticorpos, seria suficiente para evitar doença.

O canídeo Nº 1 (Mia) apresentava no dia da primeira sessão de quimioterapia uma anemia muito grave, trombocitopénia e leucocitose com neutrofilia. Este animal tinha uma massa tumoral muito hemorrágica e de grandes dimensões na vagina. Dado que a cadela tinha sido encontrada recentemente nessas condições a hemorragia já se devia prolongar há

vários dias, o que explica a gravidade da anemia. A mesma perda de sangue explica a trombocitopenia. A leucocitose com neutrofilia reflecte muito provavelmente um estado de infecção associado ao tipo de lesões existentes. O canídeo Nº 2 (Sting) apresentou entre a primeira e a terceira sessão de quimioterapia um conjunto de novos sintomas, hematuria, poliúria e prostração. Através de uma análise de urina tipo II foi possível determinar a presença de cristais de biurato de amónio e eritrócitos na urina. Este animal tinha sido diagnosticado como *Leishmania* positivo em Janeiro de 2011 e encontrava-se a fazer tratamento com alopurinol desde então. O canídeo Nº 3 (Guga) apresentou sinais clínicos de doença (diarreia na semana que antecedeu a terceira sessão de quimioterapia), alterações que ficaram resolvidas com o tratamento prescrito (ver Anexo 1). Os restantes 6 canídeos, não apresentaram nenhuma alteração de realçar no hemograma ou sinais clínicos que sobressaíssem tanto na primeira como na terceira sessão de quimioterapia. Apenas o canídeo Nº3 (Guga) apresentou durante o tratamento sinais clínicos que poderiam indicar algum grau de imunodepressão.

5. Avaliação dos títulos de anticorpos

Dentro do grupo de 9 canídeos a realizar quimioterapia, apenas 1 tinha estatuto vacinal desconhecido para o PVC (Nº1, Mia). Todos os outros tinham sido vacinados regularmente, sendo que a maioria não era vacinado há mais de 12 meses. Apesar de alguns dos canídeos não serem vacinados há mais de 1 ano, em princípio estariam protegidos contra a parvovirose. Num estudo publicado em 2004 (Mouzin, Lorenzen, Haworth & King, 2004) conclui-se que a vacinação contra o PVC induz uma resposta serológica, produção de anticorpos, por um período de tempo até ou superior aos 48 meses (4 anos). Nenhum dos animais foi vacinado durante o tratamento.

Na tabela 8 são apresentados os títulos de anticorpos para o PVC que foram determinados nos animais em estudo, na primeira (antes do início do tratamento) e terceira sessão de quimioterapia. Já na tabela 9 são apresentados os títulos de anticorpos para o PVC e detecção do vírus no plasma dos canídeos saudáveis.

Tabela 8 - Título de anticorpos para o PVC nos canídeos doentes na primeira e na terceira sessão de quimioterapia.

Animal (Nome; Nº)	Título de Anticorpos	
	1ª Sessão	3ª Sessão*
Mia (1)	≥1/1600	≥1/800
Sting (2)	≥1/400	≥1/1600
Guga (3)	≥1/400	≥1/800
Tignes (4)	≥1/3200	≥1/3200
Sushi (5)	≥1/800<1/1600	≥1/1600

Tabela 8 (continuação) - Título de anticorpos para o PVC nos canídeos doentes na primeira e na terceira sessão de quimioterapia.

Animal (Nome; Nº)	Título de Anticorpos	
	1ª Sessão	3ª Sessão*
Zeus (6)	≥1/800	≥1/1600
Jox (7)	≥1/100<1/1600	≥1/200<1/400
Boogie (8)	≥1/800<1/1600	≥1/800<1/1600
Tobias (9)	≥1/800<1/1600	≥1/800<1/1600

Legenda: * no caso do canídeo Nº 1, Mia, a segunda colheita de sangue foi realizada no dia da quarta sessão de quimioterapia.

Tabela 9 – Título de anticorpos para o PVC e detecção do vírus no plasma dos canídeos saudáveis.

Animal (Nome, Letra)	Idade (anos)	ADN PVC Plasma	Título Anticorpos PVC
Canza A	0,75	•	≥1/100 <1/20000
Golias B	3	•	≥1/800 <1/1600
Rabeca C	7	•	≥1/400 <1/1600
Estrela D	10	•	≥1/6400

Legenda: • - Negativo para PVC na amostra de plasma.

O título de anticorpos para o PVC nos animais a fazer quimioterapia variou entre 1/400 e 1/3200, tendo em conta os valores determinados para a primeira e terceira sessão. O título de anticorpos para o PVC diminuiu apenas num animal, Nº1 (Mia); manteve-se em 3 animais Nº 4, 8 e 9 (Tignes, Boogie e Tobias, respectivamente) e aumentou em 5 dos animais, Nº 2, 3, 5, 6 e 7 (Sting, Guga, Sushi, Zeus e Jox, respectivamente). O aumento do título de anticorpos verificado nos 5 canídeos, uma vez que nenhum dos animais foi vacinado durante o tratamento, sugere que estes animais possam ter tido uma resposta humoral à exposição natural ao vírus, em ambiente hospitalar ou na sua rotina diária.

Resumindo os resultados das alterações dos títulos de anticorpos para o PVC dos animais de quimioterapia temos: em cerca de 44% dos animais o título de anticorpos duplicou; em cerca de 11% (corresponde a apenas 1 animal) o título de anticorpos quadruplicou; em aproximadamente 33% dos animais o título de anticorpos manteve-se e finalmente em aproximadamente 11% (corresponde a apenas 1 animal) houve uma diminuição do título de anticorpos para metade. Estes resultados estão de acordo com uma publicação anterior,

(Henry et al., 2001), em que as variações dos títulos de anticorpos para o PVC em canídeos submetidos a quimioterapia foram semelhantes.

O título de anticorpos dos animais saudáveis variou entre 1/100 e 1/20000, no caso do canídeo A de 9 meses (ter em conta que segundo o *kit* o título de anticorpos seria aproximadamente 1/32000) e maior ou igual a 1/6400, no caso do canídeo D de 10 anos. Todos os animais saudáveis foram vacinados anteriormente; o canídeo A, de 9 meses, tinha efectuado as vacinas aconselhadas no calendário de vacinação; o canídeo B, de 3 anos, tinha sido vacinado para o PVC pela última vez em Maio de 2011; o canídeo C, de 7 anos, tinha sido vacinado para o PVC pela última vez há um ano e o canídeo D, de 10 anos, já não era vacinado para o PVC há mais de 1 ano.

Nunca foi determinado o título de anticorpos protector contra o PVC através do teste de *ELISA* indirecto, logo a única forma de ter noção se os títulos de anticorpos de animais doentes são protectores ou não é comparando-o com o de animais saudáveis.

As diferenças entre os títulos de anticorpos para o PVC nos animais submetidos a quimioterapia antes de iniciarem o tratamento e os títulos de anticorpos do grupo de animais saudáveis e as diferenças entre os títulos de anticorpos para o PVC nos animais submetidos a quimioterapia após duas sessões de tratamento e os títulos de anticorpos do grupo de animais saudáveis foram avaliadas pelo *Mann-Whitney Test*. As duas hipóteses nulas propostas foram: a mediana dos títulos de anticorpos para o PVC da população de animais submetidos a quimioterapia antes de iniciarem o tratamento (1ª sessão) e a mediana dos títulos de anticorpos para o PVC da população de animais saudáveis do grupo controlo é igual e a mediana dos títulos de anticorpos para o PVC da população de animais submetidos a quimioterapia após duas sessões de tratamento (3ª sessão) e a mediana dos títulos de anticorpos para o PVC da população de animais saudáveis do grupo controlo é igual.

Tabela 10 – Resultados da avaliação estatística utilizando o *Mann-Whitney Test* da relação entre os títulos de anticorpos para o PVC da população de animais submetidos a quimioterapia antes de iniciarem o tratamento (1ª sessão) e os títulos de anticorpos da população de animais saudáveis do grupo controlo.

	Ac 1ª	Controlo
Min	0.0003125	0.0001563
Máx	0.01000	0.01000
Med	0.001250	0.001875
p	0.8730	

Legenda: Min: valor mínimo; Máx: valor máximo; Med: mediana; p – valor de p; Ac 1ª: títulos de anticorpos para o PVC dos animais submetidos a quimioterapia antes de iniciarem o tratamento; Controlo: títulos de anticorpos para o PVC dos animais saudáveis do grupo controlo.

Tabela 11 - Resultados da avaliação estatística utilizando o *Mann-Whitney Test* da relação entre os títulos de anticorpos para o PVC da população de animais submetidos a quimioterapia depois de duas sessões de tratamento (3ª sessão) e os títulos de anticorpos da população de animais saudáveis do grupo controle.

	Ac 3ª	Controlo
Min	0.0003125	0.0001563
Máx	0.005000	0.01000
Med	0.001250	0.001875
p	0.4725	

Legenda: Min: valor mínimo; Máx: valor máximo; Med: mediana; p – valor de p; Ac 3ª: títulos de anticorpos para o PVC dos animais submetidos a quimioterapia no dia da 3ª sessão; Controlo: títulos de anticorpos para o PVC dos animais saudáveis do grupo controle.

Como para ambos os casos $p > 0,05$ as hipóteses nulas não poderiam ser rejeitadas. Mas para que se possa chegar a alguma conclusão sobre este tema é necessário repetir o ensaio com uma amostra maior, tanto em indivíduos em tratamento como em indivíduos saudáveis e também uma amostra mais homogênea.

A terceira hipótese nula proposta era: a mediana dos títulos de anticorpos para o PVC da população de animais submetidos a quimioterapia antes de iniciarem o tratamento (1ª sessão) e a mediana dos títulos de anticorpos para o PVC da população de animais submetidos a quimioterapia após duas sessões de tratamento (3ª sessão) é igual.

Tabela 12 - Resultados da avaliação estatística utilizando o *Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test* da relação entre os títulos de anticorpos para o PVC da população de animais submetidos a quimioterapia antes de iniciarem o tratamento (1ª sessão) e os títulos de anticorpos da população de animais submetidos a quimioterapia após duas sessões de tratamento (3ª sessão).

	Ac 1ª	Ac 3ª
Min	0.0003125	0.0003125
Máx	0.01000	0.005000
Med	0.001250	0.001250
p	0.0938	

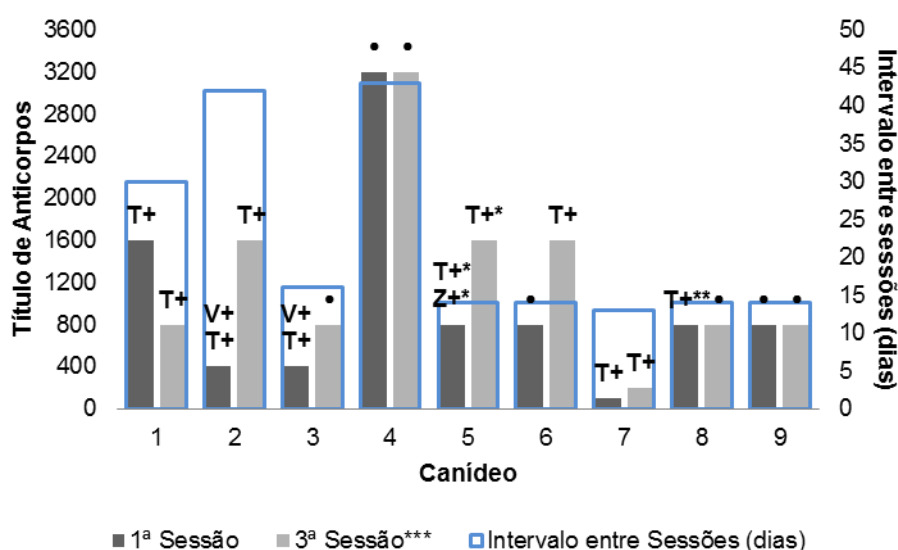
Legenda: Min: valor mínimo; Máx: valor máximo; Med: mediana; p – valor de p; Ac 1ª: títulos de anticorpos dos animais submetidos a quimioterapia no dia da 3ª sessão; Ac 3ª: títulos de anticorpos para o PVC dos animais submetidos a quimioterapia no dia da 3ª sessão.

Como neste caso o valor de p obtido através do *Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test* foi igualmente $p > 0,05$, não foi possível rejeitar a hipóse nula. Mas mais uma vez na nossa

opinião seria necessário repetir o desenho experimental com uma amostra maior e mais homogénea para poder tirar mais conclusões. Só desta forma seria possível verificar se os resultados obtidos estariam de acordo com publicações anteriores, como o artigo recente (Henry et al., 2001), em que não foram encontradas variações significativas entre os títulos de anticorpos para o PVC de animais com doenças neoplásicas sujeitos a quimioterapia imunossupressiva ao longo do tratamento nem diferenças significativas entre títulos de anticorpos para o PVC de animais saudáveis presentes à consulta para revacinação e animais a fazer quimioterapia.

6. Considerações finais

Gráfico 1 – Títulos de anticorpos para o PVC na primeira e terceira sessão de quimioterapia, detecção de ADN de PVC e intervalo de tempo entre as duas sessões de quimioterapia.



Legenda: T+ - Positivo para o PVC na amostra de células sanguíneas; V+ - Positivo para o PVC na amostra de plasma; • - Negativo para PVC em todas as amostras; T+* - Positivo vestigial para o PVC na amostra de células sanguíneas; Z+* - Positivo vestigial para o PVC na amostra de fezes; T+** - Positivo vestigial para o PVC na amostra de células sanguíneas; *** - excepto o canídeo Nº 1, Mia, cuja segunda amostra foi recolhida no dia da 4ª sessão de quimioterapia.

O intervalo de tempo entre as duas sessões de quimioterapia analisadas apresentou uma grande variabilidade entre os 9 canídeos. No caso dos 2 canídeos com TVT que efectuaram tratamento com vincristina, Nº 1 e Nº 8, o intervalo de tempo entre as duas sessões foi de 30 e 14 dias, respectivamente. Nos canídeos 3, 6, 7 e 9 com mastocitoma, que realizaram tratamento com uma associação de 2 fármacos, vimblastina e prednisolona, o intervalo de tempo entre as duas sessões foi de 16, 14, 13 e 14 dias, respectivamente. Os restantes 3 animais, Nº 2, 4 e 5, com 3 diferentes tipos de neoplasias, foram medicados com diferentes

fármacos; Nº 2 com doxorrubicina e carboplatina, o Nº 4 com doxorrubicina e o Nº 5 com protocolo de associação de fármacos CHOP. No caso destes 3 canídeos, Nº 2, 4 e 5, o intervalo entre as duas sessões de quimioterapia foi de 42, 43 e 12 dias, respectivamente.

Agora é importante entender se existe alguma relação entre a detecção de PVC, o título de anticorpos, o intervalo de tempo entre as sessões e os fármacos utilizados nos tratamentos das diferentes neoplasias.

Os canídeos com TVT, Nº 1 e Nº 8, foram tratados com vincristina, nas mesmas doses. No canídeo Nº 1 foi detectado PVC nas células sanguíneas na primeira e na terceira sessão e o título de anticorpos passou de $\geq 1/1600$ para $\geq 1/800$; o intervalo entre as duas sessões foi de 30 dias. No canídeo Nº 8 não foi detectado PVC em nenhuma das sessões (apenas vestígios do vírus na primeira sessão) e o título de anticorpos não variou, $\geq 1/800 < 1/1600$; o intervalo entre as duas sessões foi de 14 dias. Analisando estes resultados não parece haver qualquer factor em comum entre os 2 animais.

Os canídeos com mastocitoma, Nº 3, 6, 7 e 9, foram tratados com uma associação de 2 fármacos, vimblastina e prednisolona, nas mesmas doses. No canídeo Nº 3 foi detectado PVC nas células sanguíneas e no plasma na primeira sessão, o título de anticorpos aumentou de $\geq 1/400$ para $\geq 1/800$ e o intervalo entre as duas sessões foi de 16 dias; no canídeo Nº 6 foi detectado PVC nas células sanguíneas na terceira sessão de quimioterapia, o título de anticorpos aumentou de $\geq 1/800$ para $\geq 1/1600$ e o intervalo entre as duas sessões foi de 14 dias; no canídeo Nº 7 foi detectado PVC nas células sanguíneas tanto na primeira como na terceira sessão de quimioterapia, o título de anticorpos aumentou de $\geq 1/100 < 1/1600$ para $\geq 1/200 < 1/400$ e o intervalo entre sessões foi de 13 dias; no canídeo Nº 9 não foi detectado PVC, o título de anticorpos não apresentou variações mantendo-se a $\geq 1/800 < 1/1600$ e o intervalo entre as sessões foi de 14 dias. Em 3 destes animais (números 3, 6 e 7) houve um aumento do título de anticorpos e nesses mesmos 3 foi possível detectar PVC em pelo menos uma das duas sessões de quimioterapia. Cada um deles apresentava um intervalo entre sessões muito próximo do intervalo médio entre sessões do conjunto dos quatro, que era 14,25 dias.

Os animais que apresentaram o maior intervalo entre as duas sessões de quimioterapia, bem destacados dos restantes, foram os animais Nº 1, 2 e 4 com 30, 42 e 43 dias de intervalo respectivamente. O título de anticorpos diminuiu no animal Nº 1, aumentou no Nº 2 e manteve-se no Nº 4. O vírus foi detectado nas células sanguíneas na primeira e na terceira sessão de quimioterapia nos animais 1 e 2, tendo sido também detectado no plasma do animal Nº 2 na primeira sessão. No animal Nº 4 não foi detectado PVC em nenhuma das sessões. Destes 3 canídeos o Nº 4 apresentava o título mais elevado de anticorpos.

O canídeo Nº 5 (Sushi), único com linfoma, foi tratado com o protocolo de associação de fármacos CHOP. Neste animal não foi possível detectar PVC em nenhuma das sessões de quimioterapia (apenas vestígios do vírus), o título de anticorpos aumentou de $\geq 1/800 < 1/1600$

para $\geq 1/1600$ e o intervalo entre as duas sessões foi de 14 dias. Tendo em conta o tipo de tumor presente neste animal, o grau de imunossupressão antes do início do tratamento deveria ser maior que nos outros animais. Ora analisando os resultados não há nada que reflecta esse facto.

Em relação à detecção do PVC nos diferentes tipos de amostras (plasma, células sanguíneas e fezes), colhidas antes do início da quimioterapia e na terceira sessão de quimioterapia dos animais submetidos a quimioterapia, ainda não foi publicado até à data qualquer estudo semelhante que possa ser estabelecido como meio de comparação.

Numa publicação de 2005, por Gauthier, Aubert, Abrahms-Ogg, Woods e Bienzle, foi demonstrado que no final do tratamento, um conjunto de canídeos com linfoma apresentava uma diminuição do número total de linfócitos circulantes e que 14 das 20 sub-populações de linfócitos se encontravam diminuídas. Como estes parâmetros não foram avaliados antes de se iniciar o tratamento não é possível concluir que se tratou duma consequência do mesmo, poderá ter sido também uma consequência do próprio linfoma.

Também na publicação de 2006, por Walter, Biller, Lana, Bachand e Dow, foram avaliadas as variações no número total de linfócitos e nas sub-populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, em 2 grupos diferentes de canídeos submetidos a quimioterapia, antes e após o tratamento, existindo ainda um terceiro grupo de animais saudáveis. Os canídeos com linfoma e osteossarcoma apresentavam à partida um número total de linfócitos e sub-populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ inferior aquele do grupo controlo de animais saudáveis. Os parâmetros que sofreram uma variação mais marcada foram a sub-população de linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B nos animais tratados com CHOP, que uma semana após o primeiro tratamento diminuíram drasticamente. Os valores dos linfócitos T CD8⁺ voltaram a subir cerca de uma semana depois mas os valores dos linfócitos B permaneceram baixos durante 6 meses. Neste mesmo estudo foi também administrada uma vacina e a resposta vacinal (produção de anticorpos) foi depois avaliada não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os 2 grupos de animais submetidos a quimioterapia e o grupo de animais saudáveis.

Finalmente numa publicação de 2002, por Winnicka, Jagielski, Hoffmann-Jagielska e Lechowski, foram também avaliadas diferentes sub-populações de linfócitos, num grupo de animais com linfoma multicêntrico submetido a quimioterapia (antes e após o tratamento) e um grupo controlo de animais saudáveis. Os animais com linfoma apresentavam no início várias sub-populações de linfócitos com valores abaixo do normal (linfócitos T CD4⁺, CD5⁺ e CD8⁺) e uma com valores bem acima da média, os linfócitos CD21-*like*⁺. Todos estes valores normalizaram ao longo do tratamento. Também o número total de leucócitos estava aumentado nos animais com linfoma antes do tratamento, com a percentagem de linfócitos B aumentada e a de linfócitos T diminuída. Após a quimioterapia esta situação inverteu-se.

O número total de leucócitos estava diminuído, com a percentagem de linfócitos B diminuída e a de linfócitos T aumentada.

Os resultados obtidos no presente estudo vão de encontro aos das publicações existentes, ou seja, seguem a corrente que indica que a imunossupressão como consequência da administração de fármacos citostáticos no tratamento de doenças neoplásicas em cães não pode ser considerada como facto adquirido mas sim como um tema que necessita de ser mais explorado.

Considerando o desenho experimental deste estudo e tendo em conta os desenhos experimentais de estudos semelhantes, em condições ideais, seriam várias as características a alterar de forma a poder tirar conclusões mais fiáveis. Em primeiro lugar a homogeneidade e o tamanho da amostra. Neste caso os canídeos (um total de 9) foram diagnosticados com 5 tipos diferentes de neoplasias às quais foram associadas os correspondentes protocolos quimioterápicos. Não foi possível impor uma maior homogeneidade da amostra devido à casuística pouco elevada de animais submetidos a quimioterapia no Hospital Escolar da FMV. Apesar do grande número de doenças neoplásicas diagnosticadas em canídeos, a quimioterapia nem sempre está indicada ou é acessível aos proprietários. O ideal seria reduzir os tipos de neoplasias da amostra de canídeos para uma ou duas e associar a cada um dos tipos de neoplasias no máximo dois tipos diferentes de protocolos quimioterápicos. Os tempos de colheita das amostras (sangue e fezes) foram dois, o primeiro no dia da primeira sessão de quimioterapia (antes do início do tratamento) e o segundo no dia da terceira sessão de quimioterapia (entre a segunda e a terceira sessão de quimioterapia). Em estudos anteriores semelhantes o cronograma envolveu, de forma geral, um mínimo de duas colheitas, antes do início do tratamento e no final do tratamento. No caso deste estudo, devido ao limite temporal do estágio curricular não foi possível estender o intervalo entre as duas colheitas por períodos que poderiam ir até às 25 semanas (caso do linfoma). Além disso devido à elevada mortalidade associada às doenças neoplásicas (pelo menos 2 dos animais integrados no estudo vieram a falecer antes de completarem o tratamento) e ao tamanho diminuto da amostra não se poderia correr o risco de perder um único elemento. Esta situação não é a ideal pois assim nem sempre foi possível avaliar o efeito imunossupressor de todos os fármacos que integravam os protocolos utilizados.

O PVC foi eleito pois trata-se de um vírus abundante no ambiente e de fácil transmissão. A avaliação da presença do PVC nos diferentes tipos de amostras (plasma, células sanguíneas e fezes) foi útil para, em conjunto com os resultados dos hemogramas, titulação de anticorpos e sinais clínicos apresentados, perceber se o animal era ou não imunocompetente. Ou seja, se o vírus estivesse presente em algum dos tipos de amostra mas o animal não demonstrasse qualquer sinal de doença, poder-se-ia concluir que este estava protegido contra a doença provocada pelo PVC. Infelizmente não foi possível avaliar

a presença do PVC nas células sanguíneas e nas fezes dos animais saudáveis do grupo controlo, o que teria sido importante para, em conjunto com as outras variáveis analisadas, estabelecer uma comparação com os animais de quimioterapia.

Também não foi possível realizar um hemograma dos animais saudáveis do grupo de controlo. Ao contrário dos animais de quimioterapia em que o hemograma é um factor essencial para verificar se o animal pode ou não realizar o tratamento, no caso dos animais saudáveis do grupo de controlo estes foram apenas vacinados. Tal como a avaliação de presença do PVC e a determinação dos títulos de anticorpos para o PVC teria sido ideal no final do trabalho ter presente o hemograma de forma a ter um meio de comparação com os animais de quimioterapia.

A determinação do título de anticorpos para o PVC através do *ELISA* indirecto suscitou vários problemas. Como nunca foi determinado o título protector de anticorpos para o PVC através de *ELISA* indirecto, numa tentativa de contornar este problema, além dos títulos de anticorpos dos animais submetidos a quimioterapia foram também determinados os títulos de anticorpos para uma amostra de 4 animais saudáveis. Mesmo fazendo a análise estatística das medianas dos títulos de anticorpos dos animais submetidos a quimioterapia e dos animais saudáveis do grupo controlo, não foi possível determinar se as diferenças existentes eram significativas ou não. Seria necessário repetir o teste com uma amostra maior e mais homogénea. Como alternativa (com fundos e tempo ilimitado) a prova de inibição da hemaglutinação seria mais indicada, pois apesar de ser mais morosa e de maior grau de dificuldade técnico, para esta técnica já foi determinado o valor da absorvância a partir do qual o título de anticorpos correspondente é protector contra a doença. Deste modo determinando os títulos de anticorpos para o PVC dos animais submetidos a quimioterapia seria possível concluir de imediato se estes se encontravam protegidos contra a doença ou não.

Além dos parâmetros monitorizados, nas condições ideais de uma amostra grande e homogénea de indivíduos, teria sido interessantes monitorizar outros parâmetros. Tais como diferentes tipos de linfócitos como os linfócitos B e os linfócitos T CD4+ e CD8+, através da técnica de citometria de fluxo e seria também interessante realizar uma vacinação e avaliar a resposta vacinal comparando-a com a de animais saudáveis de um grupo controlo. Estes tipos de parâmetros já foram avaliados em estudos semelhantes como os de Gauthier, Aubert, Abrahms-Ogg, Woods, Bienzle, 2005, de Walter, Biller, Lana, Bachand e Dow, 2006 e Winnicka, Jagielski, Hoffmann-Jagielska e Lechowski, 2002, mas apesar destes autores terem verificado algumas alterações em certos parâmetros as suas conclusões não foram definitivas sendo necessário muito mais investigação sobre este tema.

Ao contrário da investigação em medicina humana sobre os efeitos imunossupressores da quimioterapia em que já foram avaliados em vários estudos as variações das quantidades de IgG, IgM e IgA em indivíduos submetidos a quimioterapia (Kovacs et al., 2008), até agora

em medicina veterinária ainda não foi publicado nada equivalente em canídeos. Seria assim um factor enriquecedor e traria mais algumas informações sobre a existência ou não de imunossupressão devido à quimioterapia em canídeos. A avaliação quantitativa das IgG, IgM e IgA poderia ser feita através de várias técnicas, sendo que a nefelometria e a imunoturbidimetria são das mais utilizadas em medicina humana.

V. CONCLUSÃO

Apesar do grande número de canídeos diagnosticados com doenças neoplásicas no Hospital Escolar da FMV, a quimioterapia nem sempre está indicada ou então envolve custos demasiado elevados para o proprietário. Assim o número de indivíduos que à partida poderiam integrar parte do estudo diminuiu drasticamente, o que torna a amostra muito pequena e demasiado heterogénea o que não permitiu atingir todos os objectivos pretendidos.

O objectivo deste trabalho era determinar se efectivamente a quimioterapia tem um efeito imunossupressor em canídeos. As alterações observadas nos parâmetros do hemograma, as variações nos títulos de anticorpos, a avaliação da presença do PVC no sangue e nas fezes e os sinais clínicos demonstrados pelos animais não parecem indicar a existência imunossupressão. No entanto a amostra em estudo é muito pequena e muito heterogénea (cães de diferentes idades, diferentes neoplasias, diferentes protocolos quimioterápicos, entre outros) não podendo assim extrapolar estes resultados para toda a população canina.

Mesmo a análise estatística, tendo em conta as características das amostras avaliadas (amostras muito pequenas e heterogéneas), é mais de carácter formativo, para futuras incursões na investigação científica, do que propriamente informativo.

Na tentativa de minorar os efeitos negativos da quimioterapia no estado geral e “bem estar” do animal é importante conhecer os efeitos que esta possa ter no seu sistema imunitário de forma a poder minimiza-los, através de alterações nos protocolos quimioterápicos utilizados.

Este estudo pode ser considerado um estudo prévio que permitirá abrir caminho para a investigação nesta área que é de extrema importância. Para isso seria necessário desenhar um novo plano experimental, com uma amostra muito maior e homogénea, ter um grupo controlo de animais saudáveis, definir um cronograma mais adequado e analisar diferentes parâmetros. Como exemplos desses parâmetros temos os linfócitos B e linfócitos T CD4+ e CD8+, as IgG, IgM e IgA e ainda quantificar uma resposta vacinal.

VI. BIBLIOGRAFIA

Abbas, A.K. & Lichtman, A.H. (2005). *Cellular and molecular immunology*. (5th ed.). Philadelphia: Elsevier.

Adjei AA, Hidalgo M. (2005). Intracellular signal transduction pathway proteins as targets for cancer therapy [abstract]. *Journal of Clinical Oncology*, 23 (23), 5386-5403. Acedido em Jul. 30, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15983388>

Alanko, S., Pelhiemi, TT., Salmi, T.T. (1992). Recovery of blood 6-lymphocytes and serum immunoglobulins after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 69 (6), 1481-1486.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. (4th ed.). London: GSGarland Science, Taylor & Francis Group.

Barton, C.L. (2001). Chemotherapy. In D. Boothe (Ed.), *Small animal clinical pharmacology and therapeutics*. USA: W.B. Saunders.

Binn, L.N., Lazar, E.C., Eddy, G.A., Kajima, M. (1970). Recovery and Characterization of a Minute Virus of Canines [versão electrónica]. *Infection and Immunity*, 1 (5), 503–508. Acedido em Jul. 31, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC415932/pdf/iai00293-0077.pdf>

Calvert, C.A., Leifer, C.E. & MacEwen, E.G. (1982). Vincristine for treatment of transmissible venereal tumours in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181, 163–164.

Chu, E. & DeVita, V.T. (2006). *Physician's cancer chemotherapy drug manual*. London: Jones and Bartlett Publishers International. Acedido em Ag. 21, 2011, disponível em: http://www.google.com/books?hl=pt-PT&lr=&id=v16a0Rws6k0C&oi=fnd&pg=PP9&dq=cancer+chemotherapy+manual&ots=VKnaMsPLW6&sig=MlmXqvKexpDfrtQo_B03D9aV1Y#v=onepage&q&f=false

Chun, R., De Lorimier, L.P. (2003). Update on the biology and management of canine osteosarcoma [abstract]. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 33 (3), 491-516. Acedido em Jul. 27, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12852233>

Coppoc, G.L. (2009). Chemotherapy of neoplastic diseases. In J.E. Riviere & M.G. Papich (Ed.), *Veterinary Pharmacology and therapeutics*. (9th ed.). Iowa: Wiley-Blackwell.

Couto, C.G. & Nelson, R.W. (2009). *Small animal internal medicine*. (4th ed.). St. Louis: Mosby, Elsevier.

Day, M.J. (2008). *Clinical Immunology of the dog and cat*. (2nd ed.). London: Manson Publishing Ltd.

Desario, C., Decaro, N., Campolo, M., Cavalli, A., Cirone, F., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., Camero, M. & Buonavoglia, C. (2005). Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? *Journal of Virological Methods*, 126, (1-2), 179-185.

Dinesh, N.M., Ranganath, B.N., Jayadevappa, S.M. & Srinivas, C.L. (1993). Effect of vincristine sulphate on canine transmissible venereal tumours - haematological and biochemical studies [abstract]. *Indian Veterinary Journal*, 70 (8), 741-744. Acedido em Set.

30, 2011, disponível em: <http://www.mendeley.com/research/effect-of-vincristine-sulphate-on-canine-transmissible-venereal-tumours-haematological-and-biochemical-studies-1/>

Dobson, J.M. & Morris, J. (2001). *Small animal oncology*. (3rd ed.). Oxford: Blackwell Science Ltd.

Doroshov, J.H. (2005). Targeting EGFR in non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*, 353 (2), 200-202.

Duval M, Suciu S, Ferster A, Riolland X, Nelken B, Lutz P, Benoit Y, Robert A, Manel AM, Vilmer E, Otten J, Philippe N. (2002). Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial [abstract]. *Blood*, 99 (8), 2734-2739. Acedido em Set. 10, 2011, disponível em: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/99/8/2734.full.pdf+html>

Erunal-Maral, N., Findik, M. & Aslan, S. (2000). Use of exfoliative cytology for diagnosis of transmissible venereal tumour and controlling the recovery period in the bitch [abstract]. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 107, 175–180. Acedido em Set. 30, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10887668>

Fan, T.M. (2003). Lymphoma updates. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 33(3), 455-71.

Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C. (2000). *Schalm's Veterinary Hematology*. (5th ed.). (pp.1058). Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.

Feldman, S., Hughes, W.T. & Daniel, C.B. (1975). Varicella in children with cancer: Seventy-seven cases. *Pediatrics*, 56(3), 388-97.

Feldman, S., Gigliotti, F., Bockhold, C. & Naegele, R. (1988). Measles and rubella antibody status in previously vaccinated children with cancer [abstract]. *Medical and pediatric oncology*, 16(5),308-11. Acedido em Set. 29, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3185359>

Fetting, J.H., McCarthy, L.E., Borison, H.L., Colvin, M. (1982). Vomiting induced by cyclophosphamide and phosphoramide mustard in cats [abstract]. *Cancer Treatment Reports*, 66 (8), 1625-1629. Acedido em Jul. 29, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7105052>

Fortier, L.A., Mac Harg, M.A. (1994). Topical use of 5-fluorouracil for treatment of squamous cell carcinoma of the external genitalia of horses: 11 cases (1988-1992) [abstract]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 205, 1183-1185. Acedido em Ag. 20, 2011 disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7890581>

Gaffney, E.A. (2004). The application of mathematical modelling to aspects of adjuvant chemotherapy scheduling. *Journal Mathematical Biology*, 48, 375–422.

Gauthier, M.J., Aubert, I., Abrams-Ogg, A., Woods, J.P., Bienzle, D. (2005). The immunophenotype of peripheral blood lymphocytes in clinically healthy dogs and dogs with lymphoma in remission. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19,193-199.

Goddard, A., Leisewitz, A.L. (2010). Canine parvovirus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40, 1041-1053.

Govier, S.M. (2003). Principles of treatment for mast cell tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18 (2), 103-106.

Hahn, K.A., Knapp, D.W., Richardson, R.C., Matlock, C.L. (1992). Clinical response of nasal adenocarcinoma to cisplatin chemotherapy in 11 dogs [abstract]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 200 (3), 355-357. Acedido em Jul. 24, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1548172>

Henry, C.J., McCaw, D.L., Brock, K.V., Stoker, A.M., Tyler, J.W., Tate, D.J., Higginbotham, M.L. (2001). Association between cancer chemotherapy and canine distemper virus, canine parvovirus, and rabies virus antibody titers in tumor-bearing dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219, 1238-1241.

Henry, C.J. (2003). Management of transitional cell carcinoma [abstract]. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 33 (3), 597-613. Acedido em Ag. 22, 2011 disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12852238>

Herrewegh, A.A., de Groot, R.J., Cepica, A., Egberink, H.F., Horzinek, M.C., Rottier, P.J. (1995). Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. *Journal of clinical microbiology*, 33 (3), 684-9.

Hohenhaus, A.E., Peaston, A.E., Maddison, J.E. (2002). Cancer chemotherapy. In J.E. Maddison, S.W. Page & D.B. Church (Ed.), *Small animal clinical pharmacology*. London: W.B. Saunders.

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), 542-6. Acedido em Set. 2, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8603904/>

Kahn, D.E., Emery, J.B., Smith, M.J. & Spotts, A.M. (1983). Safety and efficacy of modified-live canine parvovirus vaccine. *Veterinary Medicine & Small animal clinician*, 78, 1739-1746.

Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T. C., Dessiris, A. (2001). Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 48 (2), 85-96.

Kent, M.S., Strom, A., London, C.A., Seguin, B. (2004). Alternating carboplatin and doxorubicin as adjunctive chemotherapy to amputation or limb-sparing surgery in the treatment of appendicular osteosarcoma in dogs [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18 (4), 540-544. Acedido em Ag. 22, 2011 disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15320595>

Klein, M.K. (2003). Multimodality therapy for head and neck cancer. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 33, 615-628.

Knapp, D.W., Richardson, R.C., Bonney, P.L., Hahn, K. (1988). Cisplatin therapy in 41 dogs with malignant tumors [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2 (1), 41-46. Acedido em Jul. 24, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3221354>

Komada, Y., Zhang, S.L., Zhou, Y.W., Hanada, M., Shibata, T., Azuma, E., Sakurai, M. (1992). Cellular immunosuppression in children with acute lymphoblastic leukemia: effect of consolidation chemotherapy. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 35, 271-276.

Kosarek, C.E., Kisseberth, W.C., Gallant, S.L., Couto, C.G. (2005). Clinical evaluation of gemcitabine in dogs with spontaneously occurring malignancies [abstract]. *Journal of*

Veterinary Internal Medicine, 19 (1), 81-86. Acedido em Ag. 9, 2011 disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15715052>

Kovacs, G.T., Barany, O., Schlick, B., Csoka, M., Gado, J., Ponyi, A., Müller, J., Nemeth, J., Hauser, P., Erdelyi, D.J. (2008). Late immune recovery in children treated for malignant diseases. *Pathology and Oncology Research*, 14, 391-397.

Lamm, C.G. & Rezabek, G.B. (2008). Parvovirus infection in domestic companion animals [abstract]. *The Veterinary clinics of North America. Small animal Practice*, 38 (4), 837-50. Acedido em Jul. 30, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18501282>

Lana, S.E. (2003). Chemotherapy. In D. Lascelles & J. Dobson (Ed.), *Manual of canine and feline Oncology*. (2nd ed.). London: BSVA.

LeBlanc, A.K., Mauldin G.E., Milner, R.J., LaDue, T.A., Mauldin, G.N., Bartges, J.W. (2006). Efficacy and toxicity of BOPP and LOPP chemotherapy for the treatment of relapsed canine lymphoma. *Veterinary and comparative oncology*, 4(1), 21-32.

Locasciulli, A., Santamaria, M., Masera, G., Schiavon, E., Alberti, A. & Realdi G. (1985). Hepatitis B virus markers in children with acute leukemia: the effect of chemotherapy [abstract]. *Journal of Medical Virology*, 15(1), 29-33. Acedido em Nov. 3, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3855443>

Macartney, L., McCandlish, I.A., Thompson, H. & Cornwell, H.J. (1984). Canine parvovirus enteritis 1: Clinical, haematological and pathological features of experimental infection [abstract]. *Veterinary Record*, 115, 201-210. Acedido em Set. 7, 2011, disponível em: <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/115/9/201.abstract>

Macartney, L., McCandlish, I.A., Thompson, H. & Cornwell, H.J. (1984). Canine parvovirus enteritis 2: Pathogenesis [abstract]. *Veterinary Record*, 115 (18), 453-460. Acedido em Set. 2, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6095514>

MacEwen, E.G. & Withrow, S.J. (1996). *Small animal clinical oncology*. (2nd ed.). Philadelphia: W.B. Saunders.

Mackall, C.L., Fleisher, T.A., Brown, M.R., Magrath, I.T., Shad, A.T., Horowitz, M.E., Wexler, L.H., Adde, M.A., McClure, L.L., Gress, R.E. (1994). Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer. *Blood*, 84(7), 2221-2228.

Mackall, C.L. (1999). T-Cell immunodeficiency following cytotoxic antineoplastic therapy: A review. *The Oncologist*, 4, 370-378.

Magán, N.C., (2008). Use of firocoxib in canine cancer patients: preliminary results [versão electrónica]. In *Proceedings of the 4th Meril European Symposium on Pain Management, Split, Croatia, 22-23 May 2008*, pp.67-75. Acedido em Nov. 10, 2011, disponível em: <http://www.pet-pain-control.com/2008/download/pain-management-proceeding.pdf>

Mauldin, G.E., Fox, P.R., Patnaik, A.K., Bond, B.R., Mooney, S.C., Matus, R.E. (1992). Doxorubicin-induced cardiotoxicosis. Clinical features in 32 dogs [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 6 (2), 82-88. Acedido em Set. 11, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1588546>

McCaw, D.L., Thompson, M., Tate, D., Bonderer, A. & Chen, Y.J. (1998). Serum distemper virus and parvovirus antibody titers among dogs brought to a veterinary hospital for revaccination [abstract]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 213

(1), 72-75. Acedido em Set. 20, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9656027>

McCaw, D.L. & Hoskins, J.D. (2006). Canine viral enteritis. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. (3rd ed.). (pp.63-71). St. Louis: Elsevier Inc.

Meunier, P.C., Cooper, B.J., Appel, M.J. & Slauson, D.O. (1985). Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia [versão electrónica]. *Veterinary Pathology*, 22, 60-71. Acedido em Set. 3, 2011, disponível em: <http://vet.sagepub.com/content/22/1/60.full.pdf+html>

Meunier, P.C., Cooper, B.J., Appel, M.J., Lanieu, M.E. & Slauson, D.O. (1985). Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: sequential virus distribution and passive immunization studies [versão electrónica]. *Veterinary Pathology*, 22 (6), 617-624. Acedido em Set. 8, 2011, disponível em: <http://vet.sagepub.com/content/22/6/617.full.pdf+html>

Milton, J.S., Mcteer, P.M. & Corbet, J.J. (1997). *Introduction to Statistics* (International edition). McGraw-Hill.

Moore, A.S., Kitchell, B.E. (2003). New chemotherapy agents in veterinary medicine [abstract]. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 33 (3), 629-649. Acedido em Ag. 15, 2011 disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=search&db=pubmed&doptcmdl=Abstract&term=0195-5616%20AND%202003\[Publication%20Date\]%20AND%2033\[Volume\]%20AND%20629\[Page%20Number\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=search&db=pubmed&doptcmdl=Abstract&term=0195-5616%20AND%202003[Publication%20Date]%20AND%2033[Volume]%20AND%20629[Page%20Number])

Morrison, W.B. (2002). *Cancer in dogs and cats: Medical and Surgical Management*. [versão electrónica], 339-358. Acedido em Ag. 17, 2011, disponível em: <http://books.google.com/books?id=-LB3EUeg4okC&lpg=PA339>

Mouzin, D.E., Lorenzen, M.J., Haworth, J.D. & King, V.L. (2004). Duration of serologic response to five viral antigens in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224, 1, 55-60.

Nandi, S., Kumar, M. (2010). Canine parvovirus: current perspective. *Indian Journal of Virology*, 21(1), 31-34.

O'Brien, S.E., Roth, J.A. & Hill, B.L. (1986). Response of pups to modified-live canine parvovirus component in a combination vaccine [abstract]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 188 (7), 699-701. Acedido em Set. 20, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3700224>

O'Keefe, D.A., Sisson, D.D., Gelberg, H.B., Schaeffer, D.J., Krawiec, .DR. (1993). Systemic toxicity associated with doxorubicin administration in cats [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7 (5), 309-317. Acedido em Set. 10, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8263850>

O'Sullivan, G., Durham, P.J., Smith, J.R. & Campbell, R.S. (1984). Experimentally induced severe canine parvoviral enteritis [abstract]. *Australian Veterinary Journal*, 61 (1), 1-4. Acedido em Set. 2, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6322738?dopt=Abstract>

Otto, C.M., Drobatz, K.J. & Soter, C. (1997). Endotoxemia and tumor necrosis factor activity in dogs with naturally occurring parvoviral enteritis [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11 (2), 65-70. [abstract]. Acedido em Set. 7, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9127292>

Page, R.L., McEntee, M.C., George, S.L., Williams, P.L., Heidner, G.L., Novotney, C.A., Riviere, J.E., Dewhirst, M.W., Thrall, D.E. (1993). Pharmacokinetic and phase I evaluation of carboplatin in dogs [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7 (4), 235-240. Acedido em Ag. 4, 2011 disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8246213>

Parrish, C.R. (1995). Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Baillière's Clinical Haematology*, 8(1), 57-71.

Parrish, C.R., Have, P., Foreyt, W.J., Evermann, J.F., Senda, M., Carmichael, L.E. (1988). The global spread and replacement of canine parvovirus strains [versão electrónica]. *The Journal General Virology*, 69 (5), 1111-1116. Acedido em Set. 4, 2011, disponível em: <http://vir.sgmjournals.org/content/69/5/1111.long>

Penn, I. (1974). Chemical immunosuppression and human cancer. *Cancer*, 34, 1474-1480.

Pollock, R.V. & Carmichael, L.E. (1982). Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination [abstract]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 180 (1), 37-42. Acedido em Set. 5, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7056660>

Pollock, R.V. & Coyne, M.J. (1993). Canine parvovirus [abstract]. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 23 (3), 555-568. Acedido em Set. 4, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8389070?dopt=Abstract>

Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (2005). *Microbiology*. (6th ed.). New York: McGraw-Hill.

Prittie, J. (2004). Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention [abstract]. *Journal of Veterinary emergency and critical care*, 14 (3), 167-176. Acedido em Set. 4, 2011, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1534-6935.2004.04020.x/abstract>

Ramsey, I. (Ed.), Tennant, B (Ed.). (2001). *Manual of canine and feline infectious diseases*. London: BSVA.

Rasmussen, L., Arvin, A. (1982). Chemotherapy-induced immunosuppression. *Environmental Health Perspectives*, 43, 21-25.

Rassnick, K.M., Mauldin, G.E., Al-Sarraf, R., Mauldin, G.N., Moore, A.S., Mooney, S.C. (2002). MOPP chemotherapy for treatment of resistant lymphoma in dogs: a retrospective study of 117 cases [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16 (5), 576-580. Acedido em Jul. 10, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12322709>

Rogers, K.S., Walker, M.A. & Dillon, H.B. (1998) Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases [abstract]. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 34 (6), 463-470. Acedido em Set. 30, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9826280?dopt=Abstract>

Royals, S.R., Farese, J.P., Milner, R.J., Lee-Ambrose, L., van Gilder, J. (2005). Investigation of the effects of deracoxib and piroxicam on the in vitro viability of osteosarcoma cells from dogs [abstract]. *American Journal of Veterinary Research*, 66 (11), 1961-1967. Acedido em Set. 9, 2011, disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.2005.66.1961>

Rungsipipat, A., Srichat, W., Charoenvisa, N., Manachai, N., Jearanai, W., Wangnaitham, S., Tangkawattana, P. & Tangkawattana, S. (2009). Clinical evaluation of canine mast cell tumor treatment between combined vinblastine and prednisolone and single prednisolone. *Compendium of Clinical Pathology*, 18, 77-84.

Schultz, R.D. & Larson, L.J. (1996). The new generation of parvovirus vaccines. A comparison study. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 18, 640-641.

Skeel, RT. (2007). *Handbook of Cancer Chemotherapy*. (7th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Acedido em Ag. 18, 2011, disponível em: http://www.google.com/books?id=CG8HLvx3IIAC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=qbs_qe_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Smith-Carr, S., Macintire, D.K. & Swango, L.J. (1997) Canine parvovirus. Part I. Pathogenesis and vaccination [versão electrónica]. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 19 (2), 125-133. Acedido em Set. 2, 2011, disponível em: <http://www.scribd.com/doc/23747913/CANINE-Canine-Parvovirus-part-1-Pathogenesis-and-Vaccination>

Sorenmo, K. (2003). Canine mammary gland tumors [abstract]. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 33 (3), 573-596. Acedido em Ag. 22, 2011 disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12852237>

Sorenmo, K., Overley, B., Krick, E., Ferrara, T., LaBlanc, A. & Shofer, F. (2010). Outcome and toxicity associated with a dose-intensified, maintenance-free CHOP-based chemotherapy protocol in canine lymphoma: 130 cases. *Veterinary and Comparative Oncology*, 8 (3), 196-208.

Tizard, I.R. (2004). *Veterinary immunology: An introduction*. (7th ed.). Philadelphia: Elsevier.

Trumel, C., Bourge`s-Abella, N., Touron, C., Lanore, D., Geffre, A., Diquelou, A. F. Guelfi, J.F. & Braun, J.P. (2005). Adverse haematological effects of vinblastine, prednisolone and cimetidine treatment: a retrospective study in fourteen dogs with mast cell tumours. *Journal of Veterinary Medicine A*, 52, 275-279.

Vail, D.M. & Withrow, S.J. (2007). *Small animal clinical oncology*. (4th ed.). St. Louis: Saunders, Elsevier Inc.

Walter, C.U., Biller, B.J., Lana, S.E., Bachand, A.M., Dow, S.W. (2006). Effects of chemotherapy on immune responses in dogs with cancer. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20, 342-347.

Winnicka, A., Jagielski, D., Hoffmann-Jagielska, M., Lechowski, R. (2002). Cytometric evaluation of peripheral blood lymphocytes in dogs with lymphoma during chemotherapy. *Journal of Veterinary Medicine*, 49, 303-306.

Wolfesberger, B., Hoelzl, C., Walter, I., Reider, G. A., Fertl, G., Thalhammer, J. G., Skalicky, M., Egerbacher, M. (2006). In vitro effects of meloxicam with or without doxorubicin on canine osteosarcoma cells. *Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics*, 29 (1), 15-23.

VII. ANEXOS

1 - História clínica

O canídeo Nº 1 (Mia), fêmea inteira, indeterminada, de aproximadamente 6 anos, foi adoptado mesmo antes de iniciar a quimioterapia. Por esta razão o seu estatuto vacinal era desconhecido. Foi diagnosticado com tumor venéreo transmissível em 03/03/2011. O tumor estava localizado na vagina e a hemorragia presente era muito abundante. No dia 15/03/2011 o animal apresentava uma anemia muito grave (hematócrito (HT) 12,6%), trombocitopénia e leucocitose com neutrofilia. Devido a este conjunto de factores este animal teve de ser internado de imediato e foi realizada uma transfusão sanguínea urgente. O tratamento com o protocolo quimioterápico escolhido, vincristina (0,7 mg/m², EV, durante 6 semanas) foi realizado no próprio dia. Uma semana depois, no dia da segunda sessão de quimioterapia (22/03/2011), o animal apresentava neutropénia acentuada (1291/ μ l). Devido ao risco de desenvolvimento de infecções, não foi realizado o tratamento programado. No dia da quarta sessão de quimioterapia (12/04/2011), o canídeo apresentava trombocitose, encontrando-se os valores dos neutrófilos normalizados. Por esta razão foi feito o tratamento com a vincristina.

O canídeo Nº 2 (Sting), macho castrado, golden retriever, de 10 anos, foi vacinado pela última vez há mais de um ano. Em Setembro de 2009 foi-lhe diagnosticado um tumor testicular (leydigoma bilateral e seminoma) e foi castrado. Em Janeiro de 2011 foi estabelecido como *Leishmania* positivo (diluição 1/320) e tratado com alopurinol e antimoniató de meglumina (*Glucantime*). Em Fevereiro de 2011 foi realizada uma punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de um nódulo do labial. O resultado da citologia foi histiocitoma. Na cirurgia que se seguiu (29/03/2011) foram extraídos dois nódulos: um nódulo palpebral e um nódulo no bordo labial superior esquerdo. Ambos foram extraídos com aproximadamente 5 cm de margem. Os nódulos foram enviados para histopatologia, tendo sido a conclusão melanoma amelanótico (08/04/2011). O protocolo quimioterápico eleito neste caso foi uma associação entre doxorubicina (30 mg/m², EV) e carboplatina (300 mg/m², EV), alternadamente, de 3 em 3 semanas, durante 30 semanas. A quimioterapia teve início a 19/04/2011 com doxorubicina. Nesse dia o animal apresentava apenas uma anemia ligeira (HT 35,8%) e monocitopénia ligeira, por essa razão foi efectuado o tratamento. No dia 22/05/2011 o animal foi presente à consulta com hematuria, poliúria e prostração, alterações que já manifestava desde há uma semana. Nessa altura estava a ser medicado com alopurinol (10mg/kg de 12 em 12 h, (*bis in die, bid*)). Nesse mesmo dia foi feita uma colheita de urina para exame de urina tipo II e urocultura e iniciado o tratamento com *Clavamox DT* (amoxicilina e ácido clavulânico; 875mg e 125mg respectivamente; 1

comprimido *bid*). O resultado das análises de urina realizadas revelou a presença de cristais de biurato de amónio e de eritrócitos. O tratamento com o antibiótico manteve-se durante 21 dias. No dia da terceira sessão de quimioterapia (31/05/2011), o canídeo apresentava apenas uma anemia (HT 35%) e trombocitose ligeiras ($567 \times 10^3/\mu\text{l}$). Assim foi realizado o segundo tratamento com doxorrubicina.

O canídeo Nº 3 (Guga), fêmea inteira, golden retriever, com 12 anos, foi vacinada pela última vez em Junho de 2008. Foi-lhe diagnosticado um mastocitoma de grau III em 3/05/2011, após exérese de três massas (dois nódulos do tamanho de tangerinas na zona da articulação escápulo-umeral direita e um nódulo do tamanho de uma noz na zona cervical dorsal). Após a cirurgia e o conhecimento do resultado da histopatologia foi iniciada a quimioterapia que incluía uma associação entre vimblastina e prednisolona (vimblastina, $2\text{mg}/\text{m}^2$ em 8 sessões; prednisolona, $1\text{mg}/\text{kg}$ *sid* durante 15 dias, $0,5\text{mg}/\text{kg}$ *sid* durante 10 semanas). Antes do início da quimioterapia o animal já estava a ser medicado com prednisolona (*Lepicortinolo* 20mg, 2 comprimidos *sid*). Na primeira sessão de quimioterapia (10/05/2011), o animal apresentava um hemograma normal, tendo sido efectuado o tratamento com vimblastina. Na terceira sessão de quimioterapia (26/06/2011), os proprietários mencionaram que o canídeo estava com diarreia há 5 dias. No hemograma realizado no próprio dia apenas era de notar uma anemia ligeira. Foi realizado o tratamento programado e o animal foi medicado com metronidazol (*Flagyl* 250mg, 2,5 comprimidos, *bid*, durante 7 dias) e sucralfato (1 saqueta, *bid*, durante 7 dias).

O canídeo Nº 4 (Tignes), macho inteiro, labrador retriever, de 6 anos, foi vacinado pela última vez em 2010. A 20 de Abril de 2011 foi-lhe diagnosticado um tumor sólido da tiróide, através de análise histopatológica após cirurgia, e hipotiroidismo. O protocolo quimioterápico seleccionado foi a doxorrubicina ($30\text{ mg}/\text{m}^2$), como fármaco único, a cada 3 semanas num total de 5 sessões. Iniciou a quimioterapia a 10 de Maio de 2011. Nesse mesmo dia o animal apresentava uma anemia e leucopénia ligeiras, tendo sido efectuado a tratamento agendado. Na terceira sessão de quimioterapia, a 22 de Junho de 2011, a anemia e a leucopénia mantinham-se dentro dos mesmos valores, logo o fármaco foi administrado como estava previsto.

O canídeo Nº 5 (Sushi), fêmea inteira, labrador retriever, de 2 anos, foi vacinada pela última vez há menos de 1 ano. Após a realização de uma PAAF do baço e do fígado, foi diagnosticado a 17 de Maio de 2011 um linfoma de alto grau de malignidade. O tratamento escolhido foi o protocolo de associação dos fármacos ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisolona (CHOP) (ciclofosfamida, $200\text{mg}/\text{m}^2$; doxorrubicina, $30\text{mg}/\text{m}^2$; vincristina, $0,7\text{mg}/\text{m}^2$; prednisolona, $2\text{mg}/\text{kg}$ *sid* durante 7 dias, $1,5\text{mg}/\text{kg}$ *sid* durante 7 dias,

1mg/kg *sid* durante 7 dias e 0,5mg/kg *sid* durante 7 dias), durante 25 semanas. Na primeira sessão de quimioterapia, no dia 24 de Maio de 2011, este animal apresentava unicamente uma anemia moderada (HT 23,0%), tendo realizado o tratamento previsto. No dia da terceira sessão de quimioterapia, 7 de Junho de 2011, a anemia mantinha-se dentro dos mesmos valores (HT 23,4%) apresentando-se as restantes linhas celulares dentro dos valores de referência. Assim prosseguiu-se com o tratamento.

O canídeo Nº 6 (Zeus), macho castrado, pitbull, de 7 anos, foi vacinado pela última vez há mais de um ano. A 10 de Maio de 2011 foi castrado devido a hipertrofia prostática refractária ao tratamento médico. Na mesma cirurgia foi também realizada a exérese do escroto pois tinha sido identificada previamente naquela zona uma lesão na pele de pequenas dimensões. Após análise histopatológica, a lesão no escroto foi identificada como um mastocitoma de grau III de malignidade. O protocolo quimioterápico escolhido neste caso foi uma associação entre dois fármacos, a vimblastina e a prednisolona (vimblastina, 2mg/m² em 8 sessões; prednisolona, 1mg/kg *sid* durante 15 dias, 0,5mg/kg *sid* durante 10 semanas). A primeira sessão de quimioterapia foi realizada no dia 7 de Junho de 2011. Neste dia o animal apresentava um hemograma normal. No dia 21 de Junho de 2011, na terceira sessão de quimioterapia, o animal apresentava somente uma leucopénia ligeira, tendo portanto realizado o tratamento.

O canídeo Nº 7 (Jox), macho inteiro, de 11 anos, raça indeterminada, foi vacinado pela última vez em Janeiro de 2011. A 13 de Maio de 2011 foi-lhe diagnosticado um mastocitoma de grau III de malignidade, após PAAF de uma massa no membro anterior esquerdo (MAE). Foi feita a exérese da massa e a amputação completa do membro a 23 de Maio de 2011. Para este animal, foi escolhido como tratamento quimioterápico, uma associação de 2 fármacos, vimblastina e prednisolona (vimblastina, 2mg/m² em 8 sessões; prednisolona, 1mg/kg *sid* durante 15 dias, 0,5mg/kg *sid* durante 10 semanas). Na primeira sessão de quimioterapia este animal apresentava apenas linfopénia como alteração do hemograma, tendo realizado o tratamento planeado. Na terceira sessão de quimioterapia o hemograma não apresentava nenhuma alteração.

O canídeo Nº 8 (Boogie), macho inteiro, de 2 anos, raça indeterminada, foi vacinado pela última vez em Novembro de 2010. A 20 de Junho de 2011 foi diagnosticado com um tumor venéreo transmissível após PAAF de uma massa nasal. A vincristina (0,7 mg/m², EV, durante 6 semanas) foi o fármaco escolhido para o tratamento. Na primeira sessão de quimioterapia, o animal apresentava um hemograma completamente normal. Na terceira sessão de quimioterapia, o hemograma também não tinha alterações. Assim o tratamento foi realizado como previsto tanto na primeira como na terceira sessão.

O canídeo Nº 9 (Tobias), macho inteiro, de 10 anos, raça labrador retriever, foi vacinado pela última vez em Dezembro de 2009. Em 2008 foi-lhe diagnosticado um mastocitoma de grau II de malignidade que foi tratado com cirurgia. Em Junho de 2011 foi-lhe diagnosticado um novo mastocitoma na axila direita que foi retirado através de cirurgia no final do mesmo mês. O tratamento seleccionado neste caso foi uma associação de 2 fármacos, vimblastina e prednisolona (vimblastina, $2\text{mg}/\text{m}^2$ em 8 sessões; prednisolona, $1\text{mg}/\text{kg}$ *sid* durante 15 dias, $0,5\text{mg}/\text{kg}$ *sid* durante 10 semanas). Tanto na primeira como na terceira sessão de quimioterapia, os hemogramas deste animal não apresentavam nenhuma alteração.

2 – Valores de referência das análises sanguíneas e quantificação de ADN.

Tabela 13 - Valores de referência das análises sanguíneas (Feldman, Zinkl & Jain, 2000).

Parâmetros	Valores de referência
Leucócitos	6-17x10 ³ /µl
Eritrócitos	5,5-8,5x10 ⁶ /µl
Plaquetas	200-500x10 ³ /µl
Hemoglobina	12-18 g/dl
Hematócrito	37-55%
VCM	60-77 fL
HCM	19,5-24,5 pg
CHCM	32-36 g/dl
Neut. Não segmentados	0-300/µl
Neut. segmentados	3000-11500/µl
Linfócitos	1000-4800/µl
Monócitos	150-1350/µl
Eosinófilos	100-1250/µl
Basófilos	Raros

Tabela 14 - Quantificação de ADN (animais 1 a 9) e ARN (animais 1 a 7) por espectrofotometria nas amostras de plasma, células sanguíneas e zaragoas rectais (total de 6 amostras por animal).

Amostra	ADN ng/µl
miav1	5,7
miat1	7,6
miav2	5,6
miat2	20,5
miaz1	3,2
miaz2	2,4
stingv1	3,2
stingt1	19,2
stingv2	4,5
stingt2	18,1
stingz1	7,9
stingz2	7
gugav1	7
gugat1	30,1
gugav2	7,4
gugat2	12,9
gugaz1	11,2

Amostra	ARN ng/µl
miav1	5,1
miat1	6,3
miav2	5,6
miat2	16,6
miaz1	2,9
miaz2	2,5
stingv1	3,1
stingt1	15,4
stingv2	4,2
stingt2	12,9
stingz1	6,9
stingz2	5,9
gugav1	5,7
gugat1	2,8
gugav2	5,6
gugat2	10,4
gugaz1	8,5

gugaz2	7,4
tignesv1	3,6
tignest1	18,4
tignesv2	2,5
tignest2	23,9
tignesz1	10,8
tignesz2	7,6
sushiv1	7,7
sushit1	16,6
sushiv2	6,3
sushit2	10,9
sushiz1	8,1
sushiz2	14,8
zeusv1	2,7
zeust1	13,6
zeusv2	10,6
zeust2	14,2
zeusz1	65,6
zeusz2	53,8
joxv1	8,8
joxt1	35,1
joxv2	8,8
joxt2	9,6
joxz1	65,1
joxz2	7,2
boogiev1	2,44
boogiet1	134,5
boogiev2	11,7
boogiet2	8,9
boogiez1	32,2
boogiez2	23,7
tobiasv1	3,8
tobiast1	19,7
tobiasv2	1,4
tobiast2	42,4
tobiasz1	18,5
tobiasz2	31,1

gugaz2	6
tignesv1	3,1
tignest1	14,9
tignesv2	2
tignest2	18,9
tignesz1	8,9
tignesz2	5,7
sushiv1	5,7
sushit1	13,2
sushiv2	4,9
sushit2	9
sushiz1	6,1
sushiz2	11,6
zeusv1	2,8
zeust1	11,1
zeusv2	7,8
zeust2	11,2
zeusz1	52,2
zeusz2	42,4
joxv1	5,9
joxt1	27,4
joxv2	6,8
joxt2	9
joxz1	50,4
joxz2	6,7

Tabela 15 - Quantificação de ADN por espectrofometria nas amostras de plasma dos 4 animais saudáveis.

Amostra	ADN ng/ μ l
canza	2,1
estrela	23,2
rabeca	4,8
golias	2,6

3 – Títulos de anticorpos e detecção de PVC (animais doentes e animais saudáveis)

Tabela 16 – Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do *kit* de *ELISA* para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de sangue (células e plasma) e fezes da primeira e quarta sessão de quimioterapia do canídeo N° 1 (Mia).

Animal (Nome;N°)	Sessão	ADN PVC	Diluição	Título Kit	Animal	Sessão	ADN	Diluição	Título Kit
Mia ①	1ª	T+	1/100	1126	Mia ①	4ª	T+	1/100	606
			1/800	201				1/400	297
			1/1600	114				1/800	121

Tabela 17 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do *kit* de *ELISA* para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de sangue (células e plasma) e fezes da primeira e terceira sessão de quimioterapia do canídeo N° 2 (Sting).

Animal (Nome;N°)	Sessão	ADN PVC	Diluição	Título Kit	Animal	Sessão	ADN	Diluição	Título Kit
Sting ②	1ª	V+	1/100	3166	Sting ②	3ª	T+	1/100	876
			1/200	818				1/400	406
		T+	1/400	326				1/800	172
								1/1600	108

Tabela 18 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do *kit* de *ELISA* para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de sangue (células e plasma) e fezes da primeira e terceira sessão de quimioterapia do canídeo N° 3 (Guga).

Animal (Nome;N°)	Sessão	ADN PVC	Diluição	Título Kit	Animal	Sessão	ADN	Diluição	Título Kit
Guga ③	1ª	V+	1/100	3434	Guga ③	3ª	•	1/100	276
			1/200	668				1/400	244
		T+	1/400	248				1/800	136

Tabela 19 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do *kit* de *ELISA* para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de

sangue (células e plasma) e fezes da primeira e terceira sessão de quimioterapia do canídeo N° 4 (Tignes).

Animal (Nome;N°)	Sessão	ADN PVC	Diluição	Título Kit	Animal	Sessão	ADN	Diluição	Título Kit
Tignes ④	1ª	•	1/100	1653	Tignes ④	3ª	•	1/100	2030
			1/800	425				1/1600	211
			1/1600	185				1/3200	115
			1/3200	106					

Tabela 20 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do *kit* de *ELISA* para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de sangue (células e plasma) e fezes da primeira e terceira sessão de quimioterapia do canídeo N° 5 (Sushi).

Animal (Nome;N°)	Sessão	ADN PVC	Diluição	Título Kit	Animal	Sessão	ADN	Diluição	Título Kit
Sushi ⑤	1ª	T+*	1/100	1367	Sushi ⑤	3ª	T+*	1/100	1279
			1/800	131				1/800	193
			1/1600	88				1/1600	111

Tabela 21 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do *kit* de *ELISA* para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de sangue (células e plasma) e fezes da primeira e terceira sessão de quimioterapia do canídeo N° 6 (Zeus).

Animal (Nome;N°)	Sessão	ADN PVC	Diluição	Título Kit	Animal	Sessão	ADN	Diluição	Título Kit
Zeus ⑥	1ª	•	1/100	589	Zeus ⑥	3ª	T+	1/100	1193
			1/400	481				1/800	237
			1/800	289				1/1600	151

Tabela 22 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do *kit* de *ELISA* para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de sangue (células e plasma) e fezes da primeira e terceira sessão de quimioterapia do canídeo N° 7 (Jox).

Animal (Nome;Nº)	Sessão	ADN PVC	Diluição	Título Kit	Animal	Sessão	ADN	Diluição	Título Kit
Jox 7	1ª	T+	1/100	2008	Jox 7	3ª	T+	1/100	435
			1/1600	78				1/200	165
			1/3200	67				1/400	98

Tabela 23 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do *kit* de *ELISA* para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de sangue (células e plasma) e fezes da primeira e terceira sessão de quimioterapia do canídeo N° 8 (Boogie).

Animal (Nome;Nº)	Sessão	ADN PVC	Diluição	Título Kit	Animal	Sessão	ADN	Diluição	Título Kit
Boogie 8	1ª	T+**	1/100	944	Boogie 8	3ª	•	1/100	779
			1/400	335				1/400	377
			1/800	137				1/800	129
			1/1600	93				1/1600	95

Tabela 24 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do *kit* de *ELISA* para diferentes diluições das amostras e resultados da pesquisa de ADN viral nas amostras de sangue (células e plasma) e fezes da primeira e terceira sessão de quimioterapia do canídeo N° 9 (Tobias).

Animal (Nome;Nº)	Sessão	ADN PVC	Diluição	Título Kit	Animal	Sessão	ADN	Diluição	Título Kit
Tobias 9	1ª	•	1/100	1073	Tobias 9	3ª	•	1/100	701
			1/800	124				1/400	204
			1/1600	93				1/800	102
								1/1600	79

Legenda (tabelas 16 a 24): T+ - positivo para o PVC na amostra de células sanguíneas; V+ - positivo para o PVC na amostra de plasma; T+* - positivo vestigial para o PVC na amostra de células sanguíneas; Z+* - positivo vestigial para o PVC na amostra de fezes; T+** - positivo vestigial para o PVC na amostra de células sanguíneas; - negativo para a presença de anticorpos para o PVC; • - negativo para PVC em todas as amostras (plasma, células sanguíneas, fezes).

Tabela 25 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do *kit* de *ELISA* para diferentes diluições da amostra e resultados da pesquisa de ADN viral na amostra de plasma do canídeo saudável A (Canza).

Animal (Nome, letra)	Idade (anos)	ADN PVC	Diluição	Título <i>Kit</i>
Canza A	0,75	•	1/100	32165
			1/20000	84
			1/30000	72
			1/40000	71

Tabela 26 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do *kit* de *ELISA* para diferentes diluições da amostra e resultados da pesquisa de ADN viral na amostra de plasma do canídeo saudável B (Golias).


Animal (Nome, letra)	Idade (anos)	ADN PVC	Diluição	Título <i>Kit</i>
Golias B	3	•	1/100	1777
			1/800	110
			1/1600	83
			1/3200	70

Tabela 27 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do *kit* de *ELISA* para diferentes diluições da amostra e resultados da pesquisa de ADN viral na amostra de plasma do canídeo saudável C (Rabeca).

Animal (Nome, letra)	Idade (anos)	ADN PVC	Diluição	Título <i>Kit</i>
Rabeca C	7	•	1/100	677
			1/400	141
			1/800	81
			1/1600	71

Tabela 28 - Títulos de anticorpos para o PVC calculados a partir do *kit* de *ELISA* para diferentes diluições da amostra e resultados da pesquisa de ADN viral na amostra de plasma do canídeo saudável D (Estrela).

Animal (Nome, letra)	Idade (anos)	ADN PVC	Diluição	Título <i>Kit</i>
Estrela D	10	•	1/100	3683
			1/1600	69
			1/3200	64
			1/6400	3455

Legenda (tabelas 25 a 28):  negativo para a presença de anticorpos para o PVC. • - negativo para a presença de ADN viral na amostra de plasma.

4 – Resultados dos hemogramas dos animais de quimioterapia no dia da primeira e terceira sessões.

Tabela 29 – Hemogramas da primeira e quarta sessão de quimioterapia do animal N° 1 (Mia).

Animal 1 (Mia)														
	Leu	Erit	Plaq	Hem	HT	VCM	HCM	CHCM	Neut Nseg	Neut seg	Linf	Mon	Eos	Bas
1ª Sessão (15/03/11)	29,5↑	2,7↓	102↓	3,24↓	12,6↓	46,7↓	12,0↓	25,8↓	0	25665↑	3245	590	0	0
4ª Sessão (12/04/11)	6,8	7,37	757↑	12,9	37,1	50,0↓	17,4↓	34,7		3130*	3120	330	140	70

Tabela 30 - Hemogramas da primeira e terceira sessão de quimioterapia do animal N° 2 (Sting).

Animal 2 (Sting)														
	Leu	Erit	Plaq	Hem	HT	VCM	HCM	CHCM	Neut Nseg	Neut seg	Linf	Mon	Eos	Bas
1ª Sessão (19/04/11)	8,40	5,47	296	13,0	35,8↓	66,0	23,8	36,4		6340**	1570	130↓	270	50
3ª Sessão (31/05/11)	6,98	5,20↓	567↑	11,8↓	35,0↓	67,2	22,7	33,8	0	3420	3071	489	0	0

Tabela 31 - Hemogramas da primeira e terceira sessão de quimioterapia do animal N° 3 (Guga).

Animal 3 (Guga)														
	Leu	Erit	Plaq	Hem	HT	VCM	HCM	CHCM	Neut Nseg	Neut seg	Linf	Mon	Eos	Bas
1ª Sessão (10/05/11)	8,46	5,91	500	14,7	43,0	72,8	24,9↑	34,3	0	5922	1438	1015	85	0
3ª Sessão (26/05/11)	9,65	5,02↓	476	11,9↓	37,4	74,4	23,6	31,7↓	0	7527	1448	676	0	0

Tabela 32 - Hemogramas da primeira e terceira sessão de quimioterapia do animal N° 4 (Tignes).

Animal 4 (Tignes)														
	Leu	Erit	Plaq	Hem	HT	VCM	HCM	CHCM	Neut Nseg	Neut seg	Linf	Mon	Eos	Bas
1ª Sessão (10/05/11)	4,97↓	5,03↓	348	11,2↓	32,9↓	65,4	22,2	33,9	0	3181	1392	199	199	0
3ª Sessão (22/06/11)	4,52↓	4,75↓	430	10,3↓	30,4↓	64,0	21,7	33,8	0	3435	949	136	0	0

Tabela 33 - Hemogramas da primeira e terceira sessão de quimioterapia do animal N° 5 (Sushi).

Animal 5 (Sushi)														
	Leu	Erit	Plaq	Hem	HT	VCM	HCM	CHCM	Neut Nseg	Neut seg	Linf	Mon	Eos	Bas
1ª Sessão (24/05/11)	14,0	3,11↓	246	7,57↓	23,0↓	74,0	24,3	32,9	0	9800	2940	980	280	0
3ª Sessão (07/06/11)	6,57	3,21↓	259	7,65↓	23,4↓	73,1	23,8	32,6	0	4928	1248	329	66	0

Tabela 34 - Hemogramas da primeira e terceira sessão de quimioterapia do animal N° 6 (Zeus).

Animal 6 (Zeus)														
	Leu	Erit	Plaq	Hem	HT	VCM	HCM	CHCM	Neut Nseg	Neut seg	Linf	Mon	Eos	Bas
1ª Sessão (07/06/11)	8,46	6,42	252	15,3	46,8	73,0	23,9	32,7	0	5499	2030	338	592	0
3ª Sessão (21/06/11)	5,09↓	5,62	273	13,6	40,4	72,0	24,1	33,5	0	3105	1425	407	153	0

Tabela 35 - Hemogramas da primeira e terceira sessão de quimioterapia do animal N° 7 (Jox).

Animal 7 (Jox)														
	Leu	Erit	Plaq	Hem	HT	VCM	HCM	CHCM	Neut Nseg	Neut seg	Linf	Mon	Eos	Bas
1ª Sessão (09/06/11)	9,56	6,54	372	14,6	44,0	67,2	22,3	33,1	0	8508	96↓	669	287	0
3ª Sessão (22/06/11)	7,66	5,65	356	12,8	38,2	67,6	22,6	33,4	0	5592	1609	460	0	0

Tabela 36 - Hemogramas da primeira e terceira sessão de quimioterapia do animal N° 8 (Boogie).

Animal 8 (Boogie)														
	Leu	Erit	Plaq	Hem	HT	VCM	HCM	CHCM	Neut Nseg	Neut seg	Linf	Mon	Eos	Bas
1ª Sessão (30/06/11)	24,9↑	5,99	343	13,7	41,2	68,7	22,8	33,2	0	20418↑	1245	2490↑	747	0
3ª Sessão (14/07/11)	13,4	6,17	468	14,3	42,5	68,9	23,2	33,6	0	8844	2814	1072	670	0

Tabela 37 - Hemogramas da primeira e terceira sessão de quimioterapia do animal N° 9 (Tobias).

Animal 9 (Tobias)														
	Leu	Erit	Plaq	Hem	HT	VCM	HCM	CHCM	Neut Nseg	Neut seg	Linf	Mon	Eos	Bas
1ª Sessão (21/07/11)	8,53	7,20	263	16,0	49,5	68,8	22,2	32,3	0	6056	1791	682	0	0
3ª Sessão (04/08/11)	7,63	6,39	204	14,3	43,6	68,2	22,4	32,9	0	5494	1602	534	0	0

Legenda (tabelas 29 a 37): Leu: leucócitos; Erit: eritrócitos; Plaq: plaquetas; Hem: hemoglobina; HT: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; Neut Nseg: neutrófilos não segmentados; Neut seg: neutrófilos segmentados; Linf: linfócitos; Mon: monócitos (valores absolutos); Eos: eosinófilos; Bas: basófilos; * - neutrófilos segmentados e neutrófilos não segmentados; ** - neutrófilos segmentados e neutrófilos não segmentados; ↑ - Parâmetro acima dos valores de referência; ↓ - Parâmetro abaixo dos valores de referência.

5 – Análise estatística GraphPad InStat

Leucócitos

Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test

Does the median of the differences between Leuc 1^a and Leuc 3^a differ significantly from zero?

The two-tailed P value is 0.0391, considered significant.

Calculation details

Sum of all signed ranks (W) = 35.000

Sum of positive ranks (T+) = 40.000

Sum of negative ranks (T-) = -5.000

Number of pairs = 9

Assumption test: Was the pairing effective?

Nonparametric Spearman correlation coefficient (r) = 0.3587

The one-tailed P value is 0.1681, considered not significant.

Effective pairing results in a significant correlation between the columns. With these data, the pairing (or matching) appears not to be effective. The unpaired test may be more appropriate.

Summary of Data

Parameter:	Leuc 1 ^a	Leuc 3 ^a	Difference
Mean:	12.976	7.759	5.217
Number of points:	9	9	9
Std deviation:	8.467	2.603	7.674
Std error:	2.822	0.8677	2.558
Minimum:	4.970	5.000	-1.540
Maximum:	29.500	13.400	22.700
Median:	8.530	7.000	1.560
Lower 95% CI:	6.467	5.758	-0.6824
Upper 95% CI:	19.484	9.760	11.116

Eritrócitos

Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test

Does the median of the differences between Erit 1^a and Erit 3^a differ significantly from zero?

The two-tailed P value is 0.2500, considered not significant.

Calculation details

Sum of all signed ranks (W) = 21.000

Sum of positive ranks (T+) = 33.000

Sum of negative ranks (T-) = -12.000

Number of pairs = 9

Assumption test: Was the pairing effective?

Nonparametric Spearman correlation coefficient (r) = 0.3333

The one-tailed P value is 0.1927, considered not significant.

Effective pairing results in a significant correlation between the columns. With these data, the pairing (or matching) appears not to be effective. The unpaired test may be more appropriate.

Summary of Data

Parameter:	Erit 1 ^a	Erit 3 ^a	Difference
Mean:	5.374	5.487	-0.1122
Number of points:	9	9	9
Std deviation:	1.535	1.167	1.760
Std error:	0.5118	0.3891	0.5865
Minimum:	2.700	3.210	-4.670
Maximum:	7.200	7.370	0.8900
Median:	5.910	5.620	0.2800
Lower 95% CI:	4.194	4.589	-1.465
Upper 95% CI:	6.555	6.384	1.240

Plaquetas

Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test

Does the median of the differences between Pla_q 1^a and Pla_q 3^a differ significantly from zero?

The two-tailed P value is 0.2031, considered not significant.

Calculation details

Sum of all signed ranks (W) = -23.000

Sum of positive ranks ($T+$) = 11.000

Sum of negative ranks ($T-$) = -34.000

Number of pairs = 9

Assumption test: Was the pairing effective?

Nonparametric Spearman correlation coefficient (r) = 0.1167

The one-tailed P value is 0.3878, considered not significant.

Effective pairing results in a significant correlation between the columns. With these data, the pairing (or matching) appears not to be effective. The unpaired test may be more appropriate.

Summary of Data

Parameter:	Pla _q 1 ^a	Pla _q 3 ^a	Difference
Mean:	302.44	421.11	-118.67

Number of points:	9	9	9
Std deviation:	109.03	172.84	224.44
Std error:	36.342	57.613	74.815
Minimum:	102.00	204.00	-655.00
Maximum:	500.00	757.00	59.000
Median:	296.00	430.00	-21.000
Lower 95% CI:	218.64	288.25	-291.19
Upper 95% CI:	386.25	553.97	53.856

Hemoglobina

Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test

Does the median of the differences between Hem 1^a and Hem 3^a differ significantly from zero?

The two-tailed P value is 0.2500, considered not significant.

Calculation details

Sum of all signed ranks (W) = 21.000

Sum of positive ranks (T+) = 33.000

Sum of negative ranks (T-) = -12.000

Number of pairs = 9

Assumption test: Was the pairing effective?

Nonparametric Spearman correlation coefficient (r) = 0.5690

The one-tailed P value is 0.0603, considered not quite significant.

Effective pairing results in a significant correlation between the columns. With these data, the pairing (or matching) appears not to be effective. The unpaired test may be more appropriate.

Summary of Data

Parameter:	Hem 1^a	Hem 3^a	Difference
Mean:	12.146	12.172	-0.02667
Number of points:	9	9	9
Std deviation:	4.208	2.127	3.755
Std error:	1.403	0.7089	1.252
Minimum:	3.240	7.650	-9.660
Maximum:	16.000	14.300	2.800
Median:	13.700	12.800	1.200
Lower 95% CI:	8.911	10.537	-2.913
Upper 95% CI:	15.380	13.807	2.859

Hematócrito

Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test

Does the median of the differences between HT 1^a and HT 3^a differ significantly from zero?

The two-tailed P value is 0.3008, considered not significant.

Calculation details

Sum of all signed ranks (W) = 19.000

Sum of positive ranks (T+) = 32.000

Sum of negative ranks (T-) = -13.000

Number of pairs = 9

Assumption test: Was the pairing effective?

Nonparametric Spearman correlation coefficient (r) = 0.8000

The one-tailed P value is 0.0069, considered very significant.

Effective pairing results in a significant correlation between the columns. With these data, the pairing (or matching) appears to be effective.

Summary of Data

Parameter:	HT 1 ^a	HT 3 ^a	Difference
Mean:	36.533	36.444	0.08889
Number of points:	9	9	9
Std deviation:	12.055	6.292	9.680
Std error:	4.018	2.097	3.227
Minimum:	12.600	23.400	-24.500
Maximum:	49.500	43.600	6.400
Median:	41.200	37.400	2.500
Lower 95% CI:	27.267	31.608	-7.352
Upper 95% CI:	45.800	41.281	7.530

VCM

Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test

Does the median of the differences between VCM 1^a and VCM 3^a differ significantly from zero?

The two-tailed P value is 0.7344, considered not significant.

Calculation details

Sum of all signed ranks (W) = -7.000

Sum of positive ranks (T+) = 19.000

Sum of negative ranks (T-) = -26.000

Number of pairs = 9

Assumption test: Was the pairing effective?

Nonparametric Spearman correlation coefficient (r) = 0.9333

The one-tailed P value is 0.0004, considered extremely significant.

Effective pairing results in a significant correlation between the columns. With these data, the pairing (or matching) appears to be effective.

Summary of Data

Parameter:	VCM 1 ^a	VCM 3 ^a	Difference
Mean:	66.956	67.267	-0.3111
Number of points:	9	9	9
Std deviation:	8.219	7.244	1.514
Std error:	2.740	2.415	0.5048
Minimum:	46.700	50.000	-3.300
Maximum:	74.000	74.400	1.400
Median:	68.700	68.200	-0.2000
Lower 95% CI:	60.638	61.699	-1.475
Upper 95% CI:	73.273	72.835	0.8530

HCM

Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test

Does the median of the differences between HCM 1^a and HCM 3^a differ significantly from zero?

The two-tailed P value is 0.7344, considered not significant.

Calculation details

Sum of all signed ranks (W) = 7.000

Sum of positive ranks (T+) = 26.000

Sum of negative ranks (T-) = -19.000

Number of pairs = 9

Assumption test: Was the pairing effective?

Nonparametric Spearman correlation coefficient (r) = 0.9121

The one-tailed P value is 0.0007, considered extremely significant.

Effective pairing results in a significant correlation between the columns. With these data, the pairing (or matching) appears to be effective.

Summary of Data

Parameter:	HCM 1 ^a	HCM 3 ^a	Difference
Mean:	22.044	22.389	-0.3444
Number of points:	9	9	9
Std deviation:	3.895	2.017	1.994
Std error:	1.298	0.6724	0.6648
Minimum:	12.000	17.400	-5.400
Maximum:	24.900	24.100	1.300
Median:	22.800	22.700	-0.2000
Lower 95% CI:	19.051	20.838	-1.878
Upper 95% CI:	25.038	23.939	1.189

CHCM

Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test

Does the median of the differences between CHCM 1^a and CHCM 3^a differ significantly from zero?

The two-tailed P value is 0.6523, considered not significant.

Calculation details

Sum of all signed ranks (W) = -8.000

Sum of positive ranks (T+) = 18.500

Sum of negative ranks (T-) = -26.500

Number of pairs = 9

Assumption test: Was the pairing effective?

Nonparametric Spearman correlation coefficient (r) = -0.05021

The negative correlation coefficient indicates that the pairing or matching was NOT effective.

Summary of Data

Parameter:	CHCM 1 ^a	CHCM 3 ^a	Difference
Mean:	32.733	33.333	-0.6000
Number of points:	9	9	9
Std deviation:	2.870	0.8515	3.370
Std error:	0.9567	0.2838	1.123
Minimum:	25.800	31.700	-8.900
Maximum:	36.400	34.700	2.600
Median:	33.100	33.500	-0.3000
Lower 95% CI:	30.527	32.679	-3.190
Upper 95% CI:	34.939	33.988	1.990

Neutrófilos Não Segmentados

It is not possible to analyze your data because one column's SD is zero.

Neutrófilos Segmentados

Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test

Does the median of the differences between Neut seg 1^a and Neut seg 3^a differ significantly from zero?

The two-tailed P value is 0.1094, considered not significant.

Calculation details

Sum of all signed ranks (W) = 20.000

Sum of positive ranks (T+) = 24.000

Sum of negative ranks (T-) = -4.000

Number of pairs = 7

Assumption test: Was the pairing effective?

Nonparametric Spearman correlation coefficient (r) = 0.6429

The one-tailed P value is 0.0694, considered not quite significant.

Effective pairing results in a significant correlation between the columns. With these data, the pairing (or matching) appears not to be effective. The unpaired test may be more appropriate.

Summary of Data

Parameter:	Neut seg 1 ^a	Neut seg 3 ^a	Difference
Mean:	10.631	5293.1	2922.7
Number of points:	8	8	7
Std deviation:	8035.2	2056.7	4379.7
Std error:	2840.9	727.16	1655.4
Minimum:	3181.0	3105.0	-1605.0
Maximum:	25.665	8844.0	11.574
Median:	7282.0	5211.0	2394.0
Lower 95% CI:	3912.5	3573.4	-1127.9
Upper 95% CI:	17.350	7012.9	6973.4

Linfócitos

Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test

Does the median of the differences between Linf 1^a and Linf 3^a differ significantly from zero?

The two-tailed P value is > 0.9999, considered not significant.

Calculation details

Sum of all signed ranks (W) = 1.000

Sum of positive ranks (T+) = 23.000

Sum of negative ranks (T-) = -22.000

Number of pairs = 9

Assumption test: Was the pairing effective?

Nonparametric Spearman correlation coefficient (r) = 0.03333

The one-tailed P value is 0.4742, considered not significant.

Effective pairing results in a significant correlation between the columns. With these data, the pairing (or matching) appears not to be effective. The unpaired test may be more appropriate.

Summary of Data

Parameter:	Linf 1 ^a	Linf 3 ^a	Difference
Mean:	1749.7	1920.7	-171.00
Number of points:	9	9	9
Std deviation:	934.07	838.46	1130.1
Std error:	311.36	279.49	376.71
Minimum:	96.000	949.00	-1569.0
Maximum:	3245.0	3120.0	1692.0
Median:	1570.0	1602.0	125.00
Lower 95% CI:	1031.7	1276.2	-1039.7
Upper 95% CI:	2467.7	2565.2	697.68

Monócitos

Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test

Does the median of the differences between Mon 1^a and Mon 3^a differ significantly from zero?

The two-tailed P value is 0.1289, considered not significant.

Calculation details

Sum of all signed ranks (W) = 27.000

Sum of positive ranks (T+) = 36.000

Sum of negative ranks (T-) = -9.000

Number of pairs = 9

Assumption test: Was the pairing effective?

Nonparametric Spearman correlation coefficient (r) = 0.5500

The one-tailed P value is 0.0664, considered not quite significant.

Effective pairing results in a significant correlation between the columns. With these data, the pairing (or matching) appears not to be effective. The unpaired test may be more appropriate.

Summary of Data

Parameter:	Mon 1 ^a	Mon 3 ^a	Difference
Mean:	788.11	492.56	295.56
Number of points:	9	9	9
Std deviation:	709.95	264.53	504.24
Std error:	236.65	88.178	168.08
Minimum:	130.00	136.00	-359.00
Maximum:	2490.0	1072.0	1418.0
Median:	669.00	460.00	209.00
Lower 95% CI:	242.40	289.22	-92.037
Upper 95% CI:	1333.8	695.89	683.15

Eosinófilos

Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test

Does the median of the differences between Eos 1^a and Eos 3^a differ significantly from zero?

The two-tailed P value is 0.0391, considered significant.

Calculation details

Sum of all signed ranks (W) = 30.000

Sum of positive ranks (T+) = 33.000

Sum of negative ranks (T-) = -3.000

Number of pairs = 8

Note: 1 pair was excluded from calculations because both values were equal.

Assumption test: Was the pairing effective?

Nonparametric Spearman correlation coefficient (r) = 0.5134

The one-tailed P value is 0.0809, considered not quite significant.

Effective pairing results in a significant correlation between the columns. With these data, the pairing (or matching) appears not to be effective. The unpaired test may be more appropriate.

Summary of Data

Parameter:	Eos 1 ^a	Eos 3 ^a	Difference
Mean:	273.33	114.33	159.00
Number of points:	9	9	9
Std deviation:	254.11	217.55	172.70
Std error:	84.703	72.516	57.568
Minimum:	0.000	0.000	-140.00
Maximum:	747.00	670.00	439.00
Median:	270.00	0.000	199.00
Lower 95% CI:	78.009	-52.888	26.249
Upper 95% CI:	468.66	281.55	291.75

Basófilos

Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test

Does the median of the differences between Bas 1^a and Bas 3^a differ significantly from zero?

The two-tailed P value is > 0.9999, considered not significant.

Regardless of what data you enter, it is impossible for this test to yield $P < 0.05$ with so few data pairs.

Calculation details

Sum of all signed ranks (W) = -1.000

Sum of positive ranks (T+) = 1.000

Sum of negative ranks (T-) = -2.000

Number of pairs = 2

Note: 7 pairs were excluded from calculations because both values were equal.

Assumption test: Was the pairing effective?

Nonparametric Spearman correlation coefficient (r) = -0.1250

The negative correlation coefficient indicates that the pairing or matching was NOT effective.

Summary of Data

Parameter:	Bas 1 ^a	Bas 3 ^a	Difference
Mean:	5.556	7.778	-2.222
Number of points:	9	9	9
Std deviation:	16.667	23.333	30.322
Std error:	5.556	7.778	10.107
Minimum:	0.000	0.000	-70.000
Maximum:	50.000	70.000	50.000
Median:	0.000	0.000	0.000
Lower 95% CI:	-7.256	-10.158	-25.530
Upper 95% CI:	18.367	25.713	21.086

Anticorpos 1^a

Mann-Whitney Test

Do the medians of Ac 1^a and Controlo differ significantly?

The two-tailed P value is 0.8730, considered not significant.

The P value is an estimate based on a normal approximation.

The 'exact' method would not be exact, due to tied ranks.

Calculation details

Mann-Whitney U-statistic = 16.500

U' = 19.500

Sum of ranks in Ac 1^a = 61.500. Sum of ranks in Controlo = 29.500.

Summary of Data

Parameter:	Ac 1 ^a	Controlo
Mean:	0.002326	0.003477
Number of points:	9	4
Std deviation:	0.002969	0.004453
Std error:	0.0009897	0.002227
Minimum:	0.0003125	0.0001563
Maximum:	0.01000	0.01000
Median:	0.001250	0.001875
Lower 95% CI:	4,41E-02	-0.003608
Upper 95% CI:	0.004609	0.01056

Anticorpos 3^a

Mann-Whitney Test

Do the medians of Ac 3^a and Controlo differ significantly?

The two-tailed P value is 0.4725, considered not significant.

The P value is an estimate based on a normal approximation.

The 'exact' method would not be exact, due to tied ranks.

Calculation details

Mann-Whitney U-statistic = 13.000

U' = 23.000

Sum of ranks in Ac 3^a = 58.000. Sum of ranks in Controlo = 33.000.

Summary of Data

Parameter:	Ac 3 ^a	Controlo
Mean:	0.001354	0.003477
Number of points:	9	4
Std deviation:	0.001415	0.004453
Std error:	0.0004716	0.002227
Minimum:	0.0003125	0.0001563
Maximum:	0.005000	0.01000
Median:	0.001250	0.001875
Lower 95% CI:	0.0002666	-0.003608
Upper 95% CI:	0.002442	0.01056

Ac 1^a e Ac 3^a

Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test

Does the median of the differences between Ac 1^a and Ac 3^a differ significantly from zero?

The two-tailed P value is 0.0938, considered not quite significant.

Calculation details

Sum of all signed ranks (W) = 17.000

Sum of positive ranks (T+) = 19.000

Sum of negative ranks (T-) = -2.000

Number of pairs = 6

Note: 3 pairs were excluded from calculations because both values were equal.

Assumption test: Was the pairing effective?

Nonparametric Spearman correlation coefficient (r) = 0.4977

The one-tailed P value is 0.0888, considered not quite significant.

Effective pairing results in a significant correlation between the columns. With these data, the pairing (or matching) appears not to be effective. The unpaired test may be more appropriate.

Summary of Data

Parameter:	Ac 1^a	Ac 3^a	Difference
Mean:	0.002326	0.001354	0.0009722
Number of points:	9	9	9
Std deviation:	0.002969	0.001415	0.001686
Std error:	0.0009897	0.0004716	0.0005620
Minimum:	0.0003125	0.0003125	- 0.0006250
Maximum:	0.01000	0.005000	0.005000
Median:	0.001250	0.001250	0.0006250
Lower 95% CI:	4,41E-02	0.0002666	- 0.0003238
Upper 95% CI:	0.004609	0.002442	0.002268