



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO PARA LINFOMA NA DINÂMICA DE  
INFECÇÃO PELO PARVOVÍRUS CANINO

MARTA ALEXANDRA OCHOA DE PEREIRA ELIAS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida  
Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz  
Doutora Ana Mafalda Gonçalves  
Xavier Félix Lourenço  
Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

ORIENTADOR

Doutora Ana Mafalda Gonçalves  
Xavier Félix Lourenço

CO-ORIENTADOR

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2013

LISBOA





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO PARA LINFOMA NA DINÂMICA DE  
INFECÇÃO PELO PARVOVÍRUS CANINO

MARTA ALEXANDRA OCHOA DE PEREIRA ELIAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida  
Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz  
Doutora Ana Mafalda Gonçalves  
Xavier Félix Lourenço  
Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

ORIENTADOR

Doutora Ana Mafalda Gonçalves  
Xavier Félix Lourenço

CO-ORIENTADOR

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2013

LISBOA

*Para os meus pais.*



## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Doutora Ana Mafalda Lourenço, pela orientação e ajuda na procura de casos. Por me ter introduzido a novos contactos, indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho. Pelas dicas e opiniões sempre pertinentes, essenciais à estruturação da parte teórica e interpretação da parte prática e, acima de tudo, pela simpatia e incentivo na procura da perfeição.

Ao Dr. Gonçalo Vicente, pelos ensinamentos que me transmitiu ao longo do curso e estágio curricular, e pela amizade e encorajamento constantes, apesar da sua agenda atribulada. Nunca esquecerei o que fizeste pelo Spider e também por mim.

À Professora Doutora Ana Duarte e à Professora Doutora Berta São Braz, um agradecimento muito especial por todo o auxílio prestado e tempo dispendido, pela constante preocupação, dedicação e incentivo, pelos seus discursos e atitude sempre positivos, por serem ambas incansáveis.

Ao Dr. Telmo Nunes, pelo apoio fundamental na parte estatística do trabalho. Pela enorme disponibilidade e simpatia que ultrapassou em muito a sua obrigação.

À equipa do Laboratório de Virologia da FMV-UTL, em especial à Clara Cartaxeiro, pelos ensinamentos referentes à actividade laboratorial, pela companhia e amizade. À Carla Carneiro pela simpatia e luta constante com a centrífuga. À Cátia Marques, João Cota, Joana Garrido, Rodolfo Leal e Vânia Marques pela companhia e boa disposição.

À ONCOVET, em especial ao Dr. Joaquim Henriques, Liliana Sousa e Joana Farinha, por me terem recebido e deixado fazer parte da equipa durante o período de colheitas, pela disponibilidade e simpatia, pela paciência e boa disposição.

À Guarda Nacional Republicana, em especial à Tenente Ana Santos, ao Capitão Hugo Rocha, ao Major Costa Pinto, ao Tenente Coronel Leonel Monteiro, ao Tenente Coronel Lourenço da Silva e ao Tenente Bruno Lopes pela disponibilidade e colaboração, que foram cruciais para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e paciência. Por acreditarem sempre em mim e terem feito de mim aquilo que sou hoje. Cada um à sua maneira, são sem dúvida um grande exemplo.

À Cristina pela amizade e apoio, sei que posso contar sempre contigo. Ao Artur pela amizade e paciência.

Ao Spider e à Sabrina, por terem sido a melhor companhia nos momentos de estudo e concentração, pela capacidade natural que têm de me acalmar.

À Maria Silva, Filipa Mimoso, David Almeida, Patrícia Matias e Filipe Vidal, por me terem acompanhado nesta fase atribulada, por ouvirem os meus desabafos mesmo que, por vezes, não os percebessem. Obrigada pela preocupação e amizade. Sem vocês não teria conseguido manter a sanidade mental.

À Turma B, um obrigado especial à Ana Isabel Filipe, Joana Tabanez, Joana Bolacha, Carolina Merino, Alexandra Castela, Daniela Matias, Ana Afonso, Diogo Guerra, Pedro Castanheira, que me acompanharam nestes 6 anos e fizeram deste percurso o melhor que ele podia ser. Pelos momentos infantis que nos mantiveram unidos, pelas canções, pelas lágrimas, pelas gargalhadas, pelo companheirismo e amizade. Porque são todos muito especiais e não teria sido possível sem vocês. Agradeço ainda ao Felipe Almeida pelos momentos bem passados, à Inês Ajuda pela enorme colaboração na fase de colheitas, à Sofia Cabral e à Cláudia Dias pelo companheirismo e pelas memórias de Barcelona.

À equipa do Hospital Escolar da FMV-UTL, com quem tive o prazer de trabalhar durante o estágio curricular, incluindo médicos (Ana Murta, Mariana Pereira, Leonor Iglésias, Ricardo Ferreira, Ricardo Marques, António Almeida, Óscar Gamboa, Inês Marques, Alexandra Basso, Marisa Ferreira, Joana Gomes, Joana Pontes, Joana Almeida e Rodrigo Bom), enfermeiros (Rita Orêncio, Patrícia Capelas, Sandra Félix, Diogo Perdigão e Irina Knorr), auxiliares (Pedro Lourenço, Luis Silva, Carla Silva, Carla Pardal e Sofia Caldeira) e funcionários (Anita Bernardino, Lúcia Nobre, Tânia Sobral). Um obrigado especial à Ana Murta, Mariana Pereira, Leonor Iglésias, Ricardo Ferreira e Ricardo Marques pela capacidade de ensinar e partilhar conhecimentos sem nunca deixar de lado a simpatia, a amizade e o companheirismo. Ao Pedro Lourenço, por ser uma das melhores pessoas que conheço, pela amizade e conduta incansável.

Ao Professor Doutor António Ferreira, pela possibilidade de estagiar e realizar as colheitas no Hospital Escolar da FMV.

Ao Professor Doutor José Henrique pela disponibilidade e interesse demonstrado no rumo deste trabalho.

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

À Zoetis, nas pessoas dos Drs Duarte Santos e Miguel, pela disponibilização dos *kits* de ELISA TiterCHEK<sup>®</sup> CDV/CPV utilizados neste trabalho.

Aos proprietários dos animais incluídos no estudo, sem os quais ele não teria sido possível.

À Dra. Sónia Ribeiro da clínica veterinária Vetlonga, pela colaboração na recolha de amostras.

### **Influência do tratamento quimioterápico para linfoma na dinâmica de infecção pelo parvovírus canino**

A melhoria dos programas vacinais e nutricionais em medicina veterinária, bem como o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e tratamento, têm aumentado a esperança média de vida dos nossos pacientes. Em contrapartida, existe uma maior probabilidade de desenvolvimento de doenças geriátricas, especialmente do foro oncológico. O linfoma é a neoplasia hematopoiética mais frequente no cão e apresenta um excelente paralelismo com a congénere humana. Para o seu tratamento, a maioria dos protocolos quimioterápicos utilizados em medicina veterinária são modificações do protocolo CHOP, inicialmente desenvolvido para tratamento do linfoma humano. Estes fármacos exercem a sua acção sobre células em divisão activa, podendo comportar efeitos secundários, especialmente ao nível da medula óssea (neutropénia, trombocitopénia) e do tracto gastrointestinal (vómito, diarreia, anorexia).

No Homem, a combinação dos efeitos desta neoplasia (tipicamente imunodepressora) e seu tratamento torna os pacientes mais susceptíveis ao desenvolvimento de infecções oportunistas. A necessidade de caracterizar esta susceptibilidade nos nossos animais é crescente, dada a escassez de informação disponível.

Assim, este trabalho teve dois objectivos principais: verificar quais as alterações imunitárias ocorridas em oito cães submetidos ao protocolo CHOP para o tratamento de linfoma, no que se refere à dinâmica de infecção pelo parvovírus canino (CPV); e determinar qual o papel do linfoma nas referidas alterações. Esta avaliação teve como base a carga viral do CPV e a sua excreção nas fezes, bem como a respectiva resposta humoral e a comparação dos resultados obtidos com os de um grupo controlo de animais saudáveis.

As amostras foram colhidas imediatamente antes do início da primeira sessão (T0) e em mais três momentos durante os primeiros 2 ciclos de tratamento.

Contrariamente ao que se poderia pensar, não foram observadas evidências de uma diminuição da resposta imunitária, quer no momento de admissão, quer após dois ciclos de quimioterapia. Adicionalmente, os resultados obtidos indicam que a imunidade previamente estabelecida através de vacinação contra o CPV não foi significativamente comprometida, tendo os animais mantido os títulos de anticorpos vacinais capazes de responder a uma possível exposição natural. Assim, fica reforçada a ideia de que a imunodepressão como consequência de neoplasias hematopoiéticas e seus tratamentos em cães necessita de estudos mais apurados, não podendo as conclusões ser extrapoladas da medicina humana.

Palavras-chave: Imunodepressão, Linfoma canino, CHOP, Parvovírus canino, Cão



## Abstract

---

### **Influence of chemotherapy for lymphoma in canine parvovirus infection dynamics**

Improved vaccination and nutrition programs in veterinary medicine, as well as the development of new diagnostic and treatment techniques has increased the life expectancy of our patients. In contrast, there is a greater probability of developing geriatric diseases, particularly oncological. Lymphoma is the most common hematopoietic tumour in dogs and presents an excellent parallelism with the human counterpart. For its treatment, most chemotherapy protocols used in veterinary medicine are modifications of CHOP protocol, originally developed for the treatment of human lymphoma. These drugs act on actively dividing cells, and could result in side effects, especially in the bone marrow (neutropenia, thrombocytopenia), and gastrointestinal tract (vomiting, diarrhoea, anorexia).

In Man, the combination of the effects of this tumour (typically immunosuppressive) and its treatment increases patients susceptibility to opportunistic infections. The need to characterize this susceptibility in our animals is growing, given the shortage of information available.

Therefore, this study had two main objectives: to assess what immunological changes occurred in eight dogs undergoing CHOP protocol for the treatment of lymphoma, with regard to the dynamics of infection with canine parvovirus (CPV); and to determine the effect of lymphoma in such immunological changes. This evaluation was based on CPV viral load and its excretion in the faeces, as well as the dogs humoral response and the comparison of the results with those of a healthy dog control group.

Samples were collected immediately before the first session (T0) and on three additional time points during the first two treatment cycles.

Contrary to what one might think, no significant evidence of decreased immune response, either at the time of admission, or after two cycles of chemotherapy was observed. Additionally, the results indicate that previously established immunity by vaccination against CPV was not significantly impaired, and the animals maintained the vaccine antibodies titers capable of responding to a possible natural exposure. Thus, the results support the idea that immunosuppression as a result of hematopoietic neoplasms and their treatment in dogs requires further investigation, and that conclusions cannot be extrapolated from human medicine.

Keywords: Immunosuppression, Canine lymphoma, CHOP, Canine Parvovirus, Dog



<b>I. BREVE DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR</b> .....	<b>1</b>
<b>II. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>5</b>
1. A evolução da oncologia.....	5
1.1. Oncologia humana.....	5
1.2. Oncologia veterinária.....	7
1.3. Oncologia comparada: o cão como modelo animal de neoplasias humanas.....	8
2. Generalidades em oncologia veterinária.....	9
2.1. Ciclo celular.....	9
2.2. Carcinogénese.....	9
2.3. Etiologia.....	10
2.4. Tratamento.....	10
2.4.1. Quimioterapia.....	11
3. Linfoma canino.....	13
3.1. Incidência.....	13
3.2. Etiologia.....	13
3.3. Classificação.....	14
3.3.1. Classificação anatómica.....	14
3.3.2. Classificação histológica e imunofenotípica.....	14
3.4. Apresentação, sinais clínicos e síndromes paraneoplásicas.....	15
3.5. Abordagem clínica: diagnóstico e estadiamento.....	16
3.5.1. Imunofenotipagem e clonagem celular.....	17
3.6. Prognóstico.....	18
3.7. Tratamento do linfoma canino.....	19
3.7.1. Protocolos de associação de fármacos.....	20
3.7.2. Protocolos de fármaco único.....	20
3.7.3. Reindução e resgate.....	21
3.7.4. Considerações finais.....	21
4. Quimioterapia e toxicidade.....	22
4.1. Mielodepressão.....	22
4.2. Toxicidade gastro-intestinal.....	23
4.3. Outros efeitos tóxicos.....	23
5. Imunodepressão.....	25
5.1. Imunodepressão em pacientes oncológicos.....	25
5.1.1. Imunodepressão em oncologia humana.....	25
5.1.2. Imunodepressão em oncologia veterinária.....	26
5.2. Infecções oportunistas em pacientes oncológicos.....	28
5.2.1. Infecções oportunistas em oncologia humana.....	28
5.2.2. Infecções oportunistas em oncologia veterinária.....	31
5.3. Recuperação do sistema imunitário após quimioterapia.....	32
5.3.1. Recuperação do sistema imunitário em oncologia humana.....	32
5.3.2. Recuperação do sistema imunitário em oncologia veterinária.....	33
5.4. Resposta vacinal em pacientes oncológicos.....	34
5.4.1. Resposta vacinal em oncologia humana.....	34
5.4.2. Resposta vacinal em oncologia veterinária.....	36
5.5. Considerações finais: oncologia humana vs oncologia veterinária.....	38
6. Parvovírus canino.....	41
6.1. Taxonomia e estrutura molecular.....	41

6.2. Evolução do parvovírus canino .....	42
6.3. Incidência e patogenia .....	43
6.4. Diagnóstico .....	44
6.5. Profilaxia e vacinação .....	46
6.6. Resposta imunitária contra o parvovírus canino.....	48
7. Estarão os cães com neoplasias e/ou submetidos a terapêutica antineoplásica devidamente protegidos contra a reactivação ou desenvolvimento de novas infecções? .....	49
<b>III. TRABALHO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>51</b>
1. Introdução/Objectivos .....	51
2. Material e Métodos .....	52
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
1. Caracterização da amostra .....	59
2. Hemograma.....	60
2.1. Variação do hemograma dos grupos oncológico e controlo ao longo do tempo ...	60
2.2. Correlação entre os parâmetros do hemograma .....	62
2.3. Influência do linfoma no hemograma .....	63
3. Detecção de CPV nos leucócitos, plasma e fezes .....	64
3.1. Variação da concentração de CPV nos leucócitos, plasma e fezes dos animais dos grupos oncológico e controlo ao longo do tempo.....	65
3.2. Correlação entre a concentração de CPV nos leucócitos, plasma e fezes .....	66
3.3. Influência do linfoma na concentração de CPV nos leucócitos, plasma e fezes ...	67
3.4. Carga viral: grupos oncológico e controlo vs grupo da parvovirose.....	68
4. Detecção de anticorpos anti-CPV .....	69
4.1. Influência do linfoma no título de anticorpos anti-CPV .....	69
<b>V. DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
1. Hemograma.....	72
1.1. Variação do hemograma dos grupos oncológico e controlo ao longo do tempo ...	73
1.2. Correlação entre os parâmetros do hemograma .....	75
1.3. Influência do linfoma no hemograma .....	75
2. Detecção de CPV nos leucócitos, plasma e fezes .....	76
2.1. Variação da concentração de CPV nos leucócitos, plasma e fezes dos animais dos grupos oncológico e controlo ao longo do tempo.....	77
2.2. Correlação entre a concentração de CPV nos leucócitos, plasma e fezes .....	78
2.3. Influência do linfoma na concentração de CPV nos leucócitos, plasma e fezes ...	79
2.4. Carga viral: grupos oncológico e controlo vs grupo da parvovirose.....	79
3. Detecção de anticorpos anti-CPV e influência do linfoma no respectivo título.....	80
4. Considerações finais e perspectivas futuras .....	82
<b>VI. CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>87</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>97</b>
ANEXO I – Conversão de peso vivo em área de superfície corporal .....	99
ANEXO II – Classificação anatómica do linfoma canino .....	101
ANEXO III – Fármacos antineoplásicos mais utilizados no tratamento do linfoma canino ....	103
ANEXO IV – Características do grupo experimental, do grupo controlo e do grupo de animais com parvovirose .....	105
ANEXO V – Hemogramas dos animais estudados .....	107
ANEXO VI – Detecção e quantificação de CPV nos leucócitos, plasma e fezes .....	109
ANEXO VII – Detecção de anticorpos plasmáticos anti-CPV.....	111

## Índice de Figuras

---

Figura 1: Ciclo celular (adaptado de Cerón, 2009).....	9
Figura 2: Taxonomia do parvovírus canino (adaptado de Decaro & Buonavoglia, 2012) .....	41
Figura 3: Curvas de amplificação das diluições do controlo positivo ( <i>standard</i> ) (original) ....	57
Figura 4: Curvas de amplificação dos controlos negativos (original) .....	57
Figura 5: Detecção de CPV através de <i>qPCR</i> (originais) .....	110
Figura 6: Exemplos de reacções de ELISA positivas e negativas .....	112

## Índice de Tabelas

---

Tabela 1: Número de horas passados em cada serviço do Hospital Escolar durante o estágio curricular .....	1
Tabela 2: Sistema de estadiamento da OMS para linfoma (adaptado de Vail & Young, 2007)	17
Tabela 3: Variação dos aminoácidos na proteína VP2 dos diferentes CPV's (adaptado de Decaro & Buonavoglia, 2012) .....	43
Tabela 4: Protocolo CHOP-25 da Universidade de Wisconsin-Madison (UW-M 25) (adaptado de Chun, 2009) .....	53
Tabela 5: Protocolo CHOP-19 da Universidade de Wisconsin-Madison (UW-M 19) (adaptado de Vail & Young, 2007) .....	53
Tabela 6: Cronograma da recolha das amostras de trabalho .....	54
Tabela 7: <i>Primers</i> e sonda utilizados no <i>qPCR</i> para amplificação da sequência de CPV, sua localização e dimensão dos fragmentos obtidos .....	56
Tabela 8: Número médio de moléculas de CPV/ $\mu$ L (log+1) nos leucócitos, plasma e fezes dos animais estudados, ao longo do tempo .....	65
Tabela 9: Resultados do teste Tukey de comparação múltipla .....	69
Tabela 10: Conversão de peso vivo em área de superfície corporal (ASC) em cães e gatos (adaptado de Chun, et al., 2007) .....	99
Tabela 11: Características clínicas do linfoma canino em várias localizações anatómicas (adaptado de Vail & Young, 2007) .....	101
Tabela 12: Fármacos antineoplásicos mais utilizados no tratamento do linfoma canino: mecanismo de acção, toxicidade e indicações (adaptado de Chun, et al., 2007; Lana & Dobson, 2011) .....	103
Tabela 13: Características do grupo experimental.....	105
Tabela 14: Características do grupo controlo .....	105
Tabela 15: Características do grupo de animais com parvovirose.....	105

Tabela 16: Hemogramas dos animais dos grupos oncológico e controlo, ao longo do tempo	107
Tabela 17: Quantificação de CPV (moléculas/ $\mu\text{L}$ ) nos leucócitos, plasma e fezes dos animais estudados.....	109
Tabela 18: Detecção de Ac plasmáticos anti-CPV, através de ELISA semiquantitativo, nos animais do grupo oncológico, do grupo controlo e do grupo da parvovirose....	111
Tabela 19: Tabela de contingência para a detecção de Ac plasmáticos anti-CPV nos animais do grupo oncológico, do grupo controlo e do grupo da parvovirose .....	112

## Índice de Gráficos

---

Gráfico 1: Hematócrito dos animais dos grupos oncológico e controlo, ao longo do tempo	61
Gráfico 2: Monócitos ( $\log+1$ ) dos animais dos grupos oncológico e controlo, ao longo do tempo .....	61
Gráfico 3: Plaquetas dos animais dos grupos oncológico e controlo, ao longo do tempo...	61
Gráfico 4: Leucócitos dos animais dos grupos oncológico e controlo, ao longo do tempo..	61
Gráfico 5: Neutrófilos ( $\log+1$ ) dos animais dos grupos oncológico e controlo, ao longo do tempo .....	62
Gráfico 6: Linfócitos ( $\log+1$ ) dos animais dos grupos oncológico e controlo, ao longo do tempo .....	62
Gráfico 7: Correlações fortes encontradas entre o número de leucócitos $\times 10^3/\mu\text{L}$ , neutrófilos/ $\mu\text{L}$ ( $\log+1$ ) e monócitos/ $\mu\text{L}$ ( $\log+1$ ), no grupo oncológico e no grupo controlo.....	63
Gráfico 8: Hemograma dos animais do grupo oncológico e do grupo controlo, em T0.....	64
Gráfico 9: Número de moléculas de CPV ( $\log+1$ ) nos leucócitos dos animais do grupo oncológico e do grupo controlo, ao longo do tempo.....	65
Gráfico 10: Número de moléculas de CPV ( $\log+1$ ) no plasma dos animais do grupo oncológico e do grupo controlo, ao longo do tempo.....	65
Gráfico 11: Número de moléculas de CPV ( $\log+1$ ) nas fezes dos animais do grupo oncológico e do grupo controlo, ao longo do tempo.....	66
Gráfico 12: Correlação entre o número de moléculas de CPV/ $\mu\text{L}$ ( $\log+1$ ) nos leucócitos, plasma e fezes, no grupo oncológico e no grupo controlo .....	67
Gráfico 13: Número de moléculas de CPV/ $\mu\text{L}$ ( $\log+1$ ) nos leucócitos, plasma e fezes dos animais do grupo oncológico e do grupo controlo, em T0.....	67
Gráfico 14: Comparação do número de moléculas de CPV/ $\mu\text{L}$ ( $\log+1$ ) entre grupos, nos leucócitos, no plasma e nas fezes .....	68
Gráfico 15: Título de Ac anti-CPV, nos três grupos estudados.....	69

## Lista de Abreviaturas

---

a.C.	Antes de Cristo
Ac	Anticorpo(s)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antigénio(s)
AOM	Anticorpos de origem materna
ARN	Ácido ribonucleico
ASC	Área de superfície corporal
ATLS	<i>Acute Tumor Lysis Syndrome</i> (Síndrome de lise tumoral aguda)
CDV	<i>Canine Distemper Virus</i> (Vírus da esgana canina)
CF	Citometria de fluxo
CHOP	Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina, Prednisona
CID	Coagulação intravascular disseminada
COP	Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisona
CPV	<i>Canine Parvovirus</i> (Parvovírus canino)
CPV-1	<i>Canine Parvovirus type 1</i> (Parvovírus canino do tipo 1)
CPV-2	<i>Canine Parvovirus type 2</i> (Parvovírus canino do tipo 2)
CPV-2a	<i>Canine Parvovirus type 2a</i> (Parvovírus canino do tipo 2a)
CPV-2b	<i>Canine Parvovirus type 2b</i> (Parvovírus canino do tipo 2b)
CPV-2c	<i>Canine Parvovirus type 2c</i> (Parvovírus canino do tipo 2c)
CRV	<i>Canine Rabies virus</i> (Vírus da raiva canina)
CSDM	Células supressoras derivadas da linha mielóide
CT	<i>Cycle threshold</i>
d.C.	Depois de Cristo
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilendiaminotetracético)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
FPV	<i>Feline Panleukopenia Virus</i> (Vírus da panleucopénia felina)
GI	Gastrointestinal
HEFMV-UTL	Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa
Hib	<i>Haemophilus influenzae b</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
HVB	<i>Hepatitis B Virus</i> (Vírus da hepatite B)
IH	Prova de inibição da hemaglutinação
i.e.	<i>id est</i> (isto é)
Ig	Imunoglobulina(s)
IgG	Imunoglobulina G

IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso(a)
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
MOPP	Mecloretamina, Vincristina, Prednisona e Procarbazina
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
MVC	<i>Minute Virus of Canines</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD	Polidipsia
p.e.	Por exemplo
PO	<i>Per os</i> (via oral)
PU	Poliúria
qPCR	( <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> ou <i>real time PCR</i> ) (PCR em tempo real)
RC	Remissão Completa
RM	Ressonância Magnética
SC	Subcutâneo(a)
SID	<i>Semel in Die</i> (uma vez/dia)
SNC	Sistema Nervoso Central
SRE	Sistema Retículoendotelial
TC	Tomografia Computorizada
TGI	Tracto Gastrointestinal
TMV	Tempo(s) médio(s) de vida
UI	Unidades internacionais
VZV	<i>Varicella Zoster Virus</i> (Vírus da varicela e do <i>Herpes zoster</i> )
WSAVA	<i>World Small Animal Veterinary Association</i>

## Lista de Símbolos

---

%	Percentagem
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
°C	Graus Celcius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
dL	Decilitro
g	Grama
h	Hora
kg	Quilograma
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
pH	Potencial de hidrogénio iónico
qxh	<i>quaque x hour</i> (uma vez a cada x horas)
xg	Força centrífuga



## I. BREVE DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular da aluna foi realizado no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (HEFMV-UTL), por um período de 6 meses (de 1 a 30 de Setembro de 2011 e de 1 de Janeiro a 31 de Maio de 2012), na área de clínica de animais de companhia. Durante este período, a aluna frequentou os diferentes serviços do Hospital Escolar (Consulta Externa, Cirurgia, Imagiologia e Internamento), em turnos rotativos de oito horas no caso dos três primeiros e em turnos de vinte e quatro horas no caso do internamento. Assim, a aluna realizou um total de 1332 horas, sendo estas divididas pelos diferentes serviços de acordo com o ilustrado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Número de horas passados em cada serviço do Hospital Escolar durante o estágio curricular

	Consulta Externa	Cirurgia	Imagiologia	Internamento
Nº de horas	450	300	150	432

### *Consulta Externa*

O serviço de Medicina Interna permitiu à aluna assistir a um elevado número de consultas, auxiliando na realização da anamnese e exame clínico do animal, elaboração de um plano de diagnóstico e instituição de terapêutica adequada. Durante o decorrer da consulta, a aluna teve ainda oportunidade de realizar ou auxiliar o médico veterinário responsável na execução de vários procedimentos clínicos. Destes, salienta-se a colheita de sangue para análises sanguíneas, colocação de cateter para realização de fluidoterapia, medição da glicémia, drenagem de derrames pleurais e abdominais, algaliação para colheita de urina para análise e/ou esvaziamento vesical, teste de fluoresceína e teste de *Schirmer*, administração de medicamentos farmacológicos (medicação oral, subcutânea, intramuscular e endovenosa; aplicação de medicação tópica) e imunológicos (vacinas), aplicação de *microchips*, limpeza de feridas, punção aspirativa por agulha fina (PAAF), entre outros. Neste serviço foi ainda possível assistir e auxiliar na realização de exames complementares mais complexos, como radiografias, ecografias, ecocardiografias, electrocardiogramas, medição da pressão arterial e exame neurológico.

No âmbito das consultas de especialidade destacaram-se as áreas de Dermatologia e Oncologia.

Durante as consultas de Dermatologia, a aluna realizou procedimentos como raspagens de pele, tricogramas, teste da lâmpada de *Wood*, citologia por aposição e por fita-cola, observação e limpeza do conduto auditivo, zaragatoa auricular e posterior análise, testes intradérmicos e imunoterapia. A aluna pôde ainda auxiliar na realização de biópsias de pele.

Na área da Oncologia, a aluna participou nas consultas de seguimento do animal e aconselhamento dos proprietários e nas sessões de quimioterapia, incluindo a recepção e pesagem dos animais, colocação de cateteres, colheita de sangue para análises sanguíneas, administração dos fármacos e esclarecimento de dúvidas dos proprietários.

A aluna assistiu também a consultas de Ortopedia, Oftalmologia e Neurologia, tendo ainda realizado a triagem de animais na sala de espera e auxiliado na recepção e manejo de casos urgentes. Para finalizar, é ainda de referir a participação em procedimentos para o Banco de Sangue do Hospital Escolar, como dádivas de sangue, tipificação sanguínea e transfusões.

### *Cirurgia*

A passagem pelo serviço de cirurgia completou um total de dois meses, durante os quais a aluna acompanhou os animais antes, durante e após a cirurgia. Foi realizada a recepção e pesagem dos animais, preparação e administração de medicação pré-anestésica e auxílio na preparação do animal para a cirurgia (incluindo colocação de cateter e sistema de soro, intubação endotraqueal, monitorização anestésica, tricotomia e lavagem e desinfecção da zona a intervir).

Durante a cirurgia propriamente dita, a estagiária teve a oportunidade de auxiliar o cirurgião em diferentes tipos de intervenções, realizar orquiectomias em cães e gatos, ovariectomias electivas em gatas e cadelas e vários tipos de suturas. A aluna realizou também destarizações e assistiu a extracções dentárias. Relativamente à casuística observada durante a passagem por este serviço, a aluna teve oportunidade de observar as seguintes cirurgias, por ordem de frequência: mastectomias para resolução de neoplasias mamárias, orquiectomias (electivas ou associadas a testículo ectópico), ovariectomias (electivas ou associadas a piómetra), cesarianas, extracção de nódulos (mastocitomas cutâneos, lipomas, entre outros), resolução de hérnias perineais, resolução de roturas do ligamento cruzado cranial, resolução de fracturas (membros e mandíbula), resolução de hérnias discas (hemilaminectomias), resolução de hérnia gastro-esofágica, resolução de torção de estômago, rotura de vesícula biliar, exérese de cálculo vesical, rotura de bexiga, ablação do conduto auditivo externo, entre outras.

Após a cirurgia a aluna acompanhou o animal até à sua total recuperação (incluindo extubação, monitorização e correcção da temperatura corporal) e auxiliou o cirurgião na elaboração de receitas e notas de alta.

A estagiária assistiu ainda a consultas de pós-operatório, realizando pensos simples e de estabilização ortopédica (*Robert-Jones* e pensos com tala), limpeza e desinfecção de feridas e suturas e remoção de suturas cutâneas.

Por fim, o escalonamento neste serviço permitiu à aluna assistir e auxiliar na realização de exames complementares como endoscopias, rinoscopias e vídeo-otoscopias.

### *Internamento*

A rotação pelo serviço de internamento consistiu na realização de turnos de 24 horas, durante os quais a aluna foi responsável pelos animais hospitalizados nesse dia. Assim, foi função da estagiária garantir a preparação e administração das medicações prescritas para cada animal, monitorizar os seus sinais vitais e prestar cuidados relacionados com a higiene e bem-estar, incluindo limpeza das jaulas, alimentação e passeio dos animais. Durante os referidos turnos, a aluna realizou ainda vários tipos de procedimentos médicos como colocação de cateteres e sistemas de soro, colheita de sangue ou urina para análise, algaliações, medição de glicémias e pressões arteriais, limpeza e desinfecção de feridas, pensos simples e gordos, enemas, entre outros, auxiliando ainda o médico responsável, enfermeiros e auxiliares no que foi necessário.

Após instrução do médico veterinário responsável pelo internamento, a aluna teve ainda a cargo a entrega dos animais e respectiva nota de alta aos proprietários, auxiliando os últimos na compreensão da medicação prescrita e aconselhando-os sobre cuidados a ter em casa.

### *Imagiologia*

O escalonamento para o serviço de imagiologia compreendeu um total de 4 semanas. Aqui, a aluna teve a oportunidade de assistir e participar na realização de vários exames complementares imagiológicos, como a radiografia, a mielografia, a tomografia computadorizada (TC) e a ecografia (abdominal, do aparelho reprodutor e ecocardiografia). Assim sendo, a aluna participou na contenção e posicionamento dos animais aquando da realização de radiografias, ecografias e mielografias, na revelação de cassetes radiográficas e posterior análise e interpretação e em procedimentos anestésicos (administração de pré-medicação, colocação de cateter, intubação endotraqueal, monitorização e recuperação anestésicas).

### **Outros Estágios**

De 1 de Outubro de 2011 a 24 de Dezembro de 2011, a aluna realizou um estágio extra-curricular no Hospital Veterinari Molins em Barcelona, Espanha. Durante estes três meses, a aluna assistiu e auxiliou em várias consultas de referência (incluindo oftalmologia, ortopedia, dermatologia, cardiologia e neurologia), tendo existido um especial interesse na área de imagiologia (ecografia, radiografia, fluoroscopia, endoscopia, rinoscopia, tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética (RM), ecocardiografia), anestesiologia e cirurgia. Finalmente, a aluna teve ainda oportunidade de auxiliar em várias consultas de urgência, internamento geral e cuidados intensivos



## II. INTRODUÇÃO

### 1. A evolução da oncologia

A oncologia é uma área fascinante da medicina cuja história está repleta de avanços e recuos, descobertas e novas esperanças. De facto, a neoplasia é uma entidade clínica que existe desde sempre, embora só recentemente lhe tenha sido atribuída a devida importância. Enquanto a tuberculose foi o grande mal do século XIX e as doenças cardiovasculares o flagelo do século XX, parece que as neoplasias se tornarão na principal causa de morte no século XXI (Wagener, 2009). Apesar de as neoplasias constituírem um sério problema de saúde, os recentes avanços na medicina têm conseguido resultados admiráveis, permitindo que o número de sobreviventes continue a aumentar.

#### 1.1. Oncologia humana

Alguns dos primeiros registos da ocorrência de neoplasias basearam-se na observação de ossos de animais fossilizados, múmias humanas e manuscritos antigos. De facto, ossos de dinossauro descobertos recentemente evidenciavam já remanescentes de tumores vasculares. Em múmias do antigo Egipto foram também identificados carcinomas nasofaríngeos e osteossarcomas (Wagener, 2009).

As primeiras descrições oncológicas remontam a 3000 a.C., no Egipto. O mais antigo pergaminho descreve 8 casos de tumores de mama, removidos por cauterização, mencionando ainda que se trata de uma doença sem cura (American Cancer Society [ACS], 2011).

Hippocrates (460-370 a.C.), o “Pai da Medicina”, foi o primeiro a utilizar as designações “*carcinós*” e “*carcinoma*” para descrever tumores não ulcerados e tumores ulcerados, respectivamente (ACS, 2011). Em Grego, estas designações referem-se à palavra “caranguejo” e foram provavelmente escolhidas por as ramificações de uma neoplasia crescente e infiltrativa lembrarem a forma deste crustáceo. Já no Império Romano, os médicos Cornelius Celcus (28 a.C. - 50 d.C.) e Claudius Galeno (130-200 d.C) passaram a utilizar os termos “*cancer*” (correspondente Latim para “caranguejo”) e “*oncos*” (tumefacção em Grego) para se referir à doença, dando assim início à actual “oncologia”. A oncologia é hoje a ciência que estuda a natureza e etiologia das neoplasias, a sua prevenção, diagnóstico e tratamento, e ainda a recuperação e cuidados paliativos dos seus pacientes (Institut Jules Bordet [IJB], 2005; ACS, 2011). Celcus foi o primeiro a descrever as diferentes fases de evolução da doença, acreditando que apenas os tumores mais precoces poderiam ser tratados por remoção (cauterização). Assim, surge já no primeiro século a noção de que o tratamento oncológico depende do estadio da doença (IJB, 2005).

A partir do advento do período renascentista na Europa (século XV), a ciência passou por inúmeras descobertas e actualizações tendo Henri Francois le Dran (1685-1770), um

cirurgião francês, demonstrado que os tumores se desenvolviam localmente e se alastravam para os linfonodos através dos ductos linfáticos. Um século depois, verificou-se um grande desenvolvimento na área da anestesiologia, sendo possível pela primeira vez conjugar esta nova técnica com a cirurgia, na tentativa de travar a doença. Foram então desenhadas as primeiras cirurgias oncológicas, como a mastectomia (IJB, 2005; ACS, 2011).

No século XVII, dois médicos holandeses, baseando-se na observação de casos de tumor de mama em membros do mesmo agregado familiar, concluíram individualmente e quase em simultâneo que as neoplasias seriam contagiosas. Esta ideia foi tão fortemente implementada, que começaram a surgir os primeiros hospitais oncológicos, a maioria fora das cidades, como forma de prevenir uma epidemia. Estas observações podem assim ter constituído os primórdios da hereditariedade associada aos tumores e também do conhecimento de que alguns agentes infecciosos (vírus, bactérias e parasitas), esses sim contagiosos, possam funcionar como factores de risco da doença (IJB, 2005; ACS, 2011).

O aparecimento do microscópio no século XIX permitiu iniciar o estudo dos tumores a nível tissular/celular, auxiliando os cirurgiões no desenvolvimento de técnicas de remoção mais seguras e eficazes (ACS, 2011). No século XX, a descoberta do impacto do ácido desoxirribonucleico (ADN) na mutação celular possibilitou as primeiras conclusões acerca das bases moleculares da neoplasia. Começou também a entender-se o efeito que alguns químicos, radiações e agentes virais exercem no ADN celular. Finalmente, foram descobertos os oncogenes e os genes supressores de tumores e começou a utilizar-se a radio e a quimioterapia como terapêuticas adjuvantes no tratamento oncológico.

A quimioterapia foi também alvo de uma grande evolução. Durante a Segunda Guerra Mundial, os militares eram expostos a gás mostarda e, como consequência, eram observadas alterações tóxicas nas células progenitoras da medula óssea. Simultaneamente, o exército dos Estados Unidos procurava encontrar novos químicos relacionados com este gás, na tentativa de desenvolver armas mais potentes e respectivas medidas de protecção. Assim, surgiu um composto designado *mostarda nitrogenada* que se revelou eficaz no tratamento de linfoma. Este composto serviu como modelo para outros mais eficazes (como os agentes alquilantes) que danificam o ADN de células de crescimento rápido. Iniciou-se então a era da quimioterapia, tendo sido descobertos novos fármacos com capacidade de bloquear diferentes fases do ciclo celular. De facto, a primeira cura de tumores metastáticos data de 1956, tendo-se seguido taxas crescentes de remissão e cura (ACS, 2011).

Actualmente existe uma grande variedade de meios de diagnóstico, medidas preventivas e tratamento das mais variadas neoplasias. No entanto, a oncologia continua a estudar o tema, tentando encontrar novos fármacos antineoplásicos, a aperfeiçoar os protocolos quimioterápicos existentes e a identificar novas causas e factores de risco. Existe também uma preocupação constante em aumentar a especificidade dos fármacos existentes para as células-alvo (terapia lipossomal e utilização de anticorpos monoclonais) e diminuir os efeitos

secundários (combinação do tratamento com factores de estimulação de colónias de células, anti-eméticos, entre outros). Mais recente ainda foi o advento da imunoterapia oncológica (ACS, 2011). Esta evolução tem permitido um aumento da taxa de sobrevivência em pacientes oncológicos, existindo uma preocupação crescente com a sua qualidade de vida. Cada vez mais se têm em consideração questões de ordem médica (como os efeitos secundários permanentes, a possibilidade de ocorrência de novos tumores, a imunodepressão e infecções oportunistas, a necessidade de tratamentos e seguimento médico por tempo indeterminado), bem como emocional e social. Embora a palavra *cancro* tenha ainda uma conotação negativa, a ideia de que se trata de uma doença incurável e os medos que têm estado associados a ela ao longo dos tempos, estão lentamente a mudar.

## **1.2. Oncologia veterinária**

Nos últimos 30 a 40 anos, a oncologia veterinária tem sido alvo de um crescimento considerável. De facto, no final dos anos sessenta e início dos anos setenta, o principal objectivo relativamente aos tumores mais agressivos passava apenas pelo estabelecimento de um diagnóstico e a obtenção de uma necrópsia completa. À medida que se intensificou o interesse pela oncologia veterinária surgiram algumas organizações importantes. Em 1976 foi criada a primeira sociedade de oncologia veterinária, a *Veterinary Cancer Society*. Mais tarde, foram desenvolvidos os primeiros sistemas de estadiamento pela Organização Mundial de Saúde (OMS), incluindo o actual TNM (*Tumor, Node, Metastasis*), em 1978. Estes e outros progressos na oncologia veterinária não teriam sido possíveis sem o desenvolvimento de técnicas imagiológicas, como a ultrassonografia, a cintigrafia, a TC e a RM. Além disso, foi também importante a correcta aplicação de agentes anestésicos, o aparecimento de equipamento mais adequado, a experiência de médicos e cirurgiões e a melhoria nos cuidados paliativos e monitorização (MacEwen, 1999; IJB, 2005).

A cirurgia oncológica foi alvo de um grande desenvolvimento nos anos oitenta e, lentamente, começou a crescer o campo da terapêutica antineoplásica não cirúrgica. Por exemplo, a radioterapia teve oportunidade de se desenvolver devido ao facto de os animais de companhia servirem como modelo para a oncologia humana. A partir daí, a oncologia veterinária foi alvo de avanços significativos, iniciando-se o aparecimento de novos fármacos antineoplásicos (L-asparaginase, doxorrubicina, vincristina, ciclofosfamida, entre outros) que se revelaram eficazes contra linfomas, leucemias crónicas, mielomas e alguns tumores sólidos. Mais tarde, os protocolos de associação de fármacos tornaram-se uma rotina em oncologia humana e veterinária.

Em 1987, o Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária reconheceu a oncologia como uma especialidade e começou a usar-se uma abordagem terapêutica combinada, que inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Paralelamente à oncologia humana, também em medicina veterinária estão em estudo novas formas de terapêutica antineoplásica, como a

imunoterapia (Bergman, 2010), com o objectivo de melhorar as perspectivas de cura para os nossos animais.

### **1.3. Oncologia comparada: o cão como modelo animal de neoplasias humanas**

A melhoria dos programas vacinais e nutricionais em medicina veterinária e o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e tratamento têm aumentado a esperança média de vida dos nossos pacientes. Em contrapartida, existe uma maior probabilidade de desenvolver doenças geriátricas, incluindo neoplasias.

A maioria das neoplasias que ocorre em cães e gatos apresenta características e comportamento semelhantes aos seus congéneres humanos, embora com progressão mais rápida. Assim, o período entre a exposição a potenciais agentes carcinogénicos e o desenvolvimento de uma neoplasia é consideravelmente inferior ao que se verifica no Homem. Além disso, estes animais partilham o mesmo ambiente e estilos de vida que os humanos, o que os torna excelentes espécies sentinela na investigação oncológica. O estudo de novas terapêuticas nestes animais é também vantajoso relativamente à utilização de ratos e outros animais de laboratório, dado partilharem uma anatomia e fisiologia mais aproximada com a espécie humana. Assim, as neoplasias do cão e do gato representam importantes modelos para as neoplasias humanas, quer em estudos epidemiológicos, etiológicos e patológicos, quer no desenvolvimento de novas terapêuticas (Marconato, Gelain & Comazzi, 2013). Por exemplo, o linfoma, a neoplasia hematopoiética mais frequente no cão, apresenta um excelente paralelismo com a congénere humana. De facto, os cães desenvolvem tipicamente uma forma multicêntrica agressiva, comparável ao linfoma não-Hodgkin humano. Além disso, trata-se de uma doença de desenvolvimento espontâneo em animais imunocompetentes, não necessitando ser induzida em laboratório (Marconato et al., 2013).

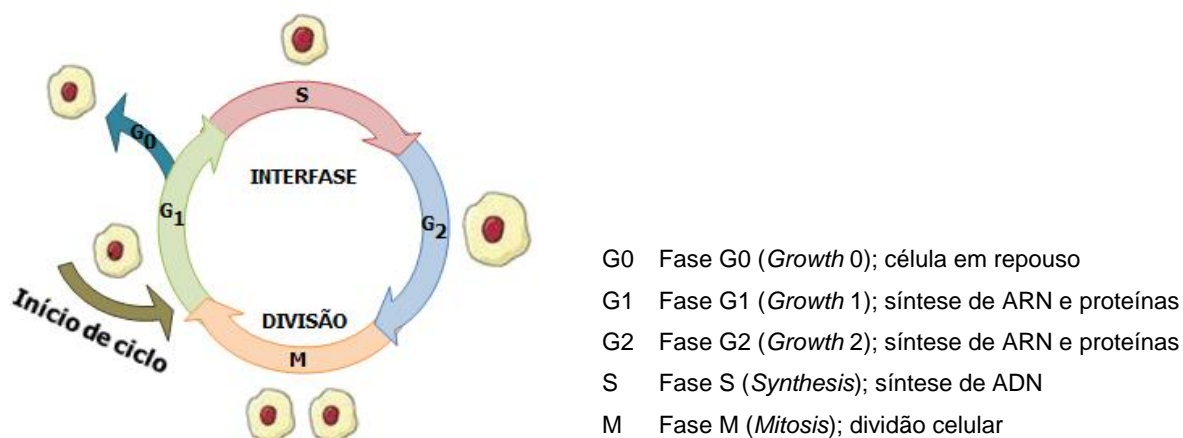
Apesar dos mais recentes avanços quer em medicina humana, quer em medicina veterinária, alguns proprietários de animais de estimação e até alguns veterinários mantêm noções derrotistas relativamente às neoplasias e ao seu tratamento, que dificultam por vezes a instituição de uma terapêutica adequada em pacientes oncológicos veterinários. No entanto, a forte divulgação das referidas descobertas tem-se revelado um factor extremamente importante para que a população se familiarize com as alternativas existentes e tem vindo a permitir a diminuição da atmosfera negativa que se criou à volta do tema. Desta forma, os proprietários estão cada vez mais receptivos à realização dos tratamentos necessários, mesmo que paliativos, facilitando o delineamento de novas modalidades terapêuticas (Vail & Young, 2007).

## 2. Generalidades em oncologia veterinária

### 2.1. Ciclo celular

Todos os tecidos do organismo, quer sejam saudáveis ou neoplásicos, são constituídos por células em divisão activa e por células em repouso (Figura 1). Os organismos multicelulares possuem uma organização interna extremamente eficaz que, em última análise, lhes permite sobreviver. A divisão, proliferação e diferenciação celulares são minuciosamente controladas de forma a criar um equilíbrio entre a morte celular e a produção de novas células. Quando células normais são sujeitas à acção de factores de *stress* passíveis de danificar o ADN ou privar a célula de oxigénio, elas são capazes de interromper o ciclo celular em G<sub>1</sub>, S ou G<sub>2</sub> e/ou sofrer morte celular programada (apoptose). A ocorrência de alterações nestes mecanismos homeostáticos pode resultar em proliferação celular descontrolada ou inibição da morte celular natural, o que faz com que células normais adquiram fenótipos malignos (Argyle & Khanna, 2007).

**Figura 1:** Ciclo celular (adaptado de Cerón, 2009)



### 2.2. Carcinogénese

As neoplasias representam uma das principais ameaças à saúde de cães e gatos. Como já foi referido, um tumor ocorre quando uma determinada célula sofre uma transformação (ex.: mutação genética) que altera os mecanismos normais que controlam a divisão e diferenciação celular. Assim, ocorre uma proliferação descontrolada dessa célula e dos seus clones, resultando no aparecimento de uma neoformação (Dobson, 2011).

A base genética da neoplasia pode ser facilmente compreendida através de um modelo designado “iniciação, promoção e progressão” (Trosko, 2001). Segundo este modelo, uma mutação genética é o passo inicial da carcinogénese (iniciação). No entanto, esta mutação isoladamente não é capaz de originar um tumor, já que as células possuem mecanismos de adaptação e reparação do ADN. Se a célula não conseguir reparar estes danos, uma

segunda mutação (ou uma série de mutações), que se acumula à primeira, é então a responsável pela transformação da célula (e dos seus clones) numa massa tumoral reconhecível (promoção). Este período de promoção é mais longo e pode ser causado pelo mesmo agente iniciador ou por outras substâncias, como factores de crescimento ou hormonas. Finalmente, uma terceira série de mutações reforça o potencial de malignidade da célula (invasão, destruição tissular e mestastização) resultando numa doença clinicamente evidente (progressão). A neoplasia é, por isso, o resultado fenotípico de uma série de eventos genéticos e não genéticos, que ocorrem ao longo do tempo (Modiano & Breen, 2007).

### **2.3. Etiologia**

A maioria dos tumores tem uma etiologia multifactorial. Por um lado, alterações genéticas ocorrem espontaneamente nas células ao longo da vida. Por outro lado, existem alguns agentes externos que também têm a capacidade de danificar o ADN e causar estas alterações, como alguns vírus (papilomavírus, retrovírus), radiações (sejam terapêuticas, de diagnóstico ou ambientais) e alguns químicos (aminas aromáticas, agentes alquilantes, entre outros) (Dobson, 2011). Factores hormonais parecem também estar envolvidos na etiologia oncológica, sendo o papel das hormonas sexuais femininas (estrogénio e progesterona) no aparecimento de neoplasias mamárias em cadelas inteiras, o exemplo mais bem estudado (Alenza, Peña, Castillo & Nieto, 2000). Por último, parece também existir uma predisposição hereditária para algumas neoplasias caninas, embora a sua base genética permaneça desconhecida (Dobson, 2011).

### **2.4. Diagnóstico e Tratamento**

Tal como referido anteriormente, nos últimos 20 anos têm-se verificado alterações importantes na atitude e abordagem dos proprietários de cães e gatos e da própria comunidade veterinária, no que se refere ao diagnóstico e tratamento de neoplasias. Actualmente, as principais armas no combate a esta doença são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. A cirurgia é o método mais eficaz no tratamento de muitas neoplasias “sólidas”, como mastocitomas, sarcomas e carcinomas de baixa malignidade. De facto, a melhoria das técnicas utilizadas e a possibilidade de remover a neoplasia com adequadas margens de segurança permite que este procedimento resulte, muitas vezes, na cura do animal. A radioterapia tem sido utilizada com sucesso no tratamento primário de tumores cerebrais e nasais, bem como em conjunto com a cirurgia no tratamento de mastocitomas e sarcomas mais invasivos. Por último, a quimioterapia continua a ser o tratamento de eleição para neoplasias sistémicas, em particular o linfoma, sendo cada vez mais empregue em associação com a cirurgia nos casos com elevado risco de metastização (Dobson, 2011).

Apesar do consenso existente quando à eficácia das modalidades actuais, continuam a ser investigadas novas formas de diagnóstico e tratamento oncológico. Por exemplo, a utilização de anticorpos monoclonais na imunofenotipagem de neoplasias, como o linfoma e a leucemia, tem demonstrado possuir um importante valor de prognóstico. Da mesma forma, a imunocitoquímica tem sido amplamente usada no diagnóstico e classificação destas e outras neoplasias. Técnicas imagiológicas avançadas (ecografia, TC e RM) têm sido imprescindíveis na detecção precoce de neoplasias e na determinação da sua extensão real, permitindo um melhor planeamento da técnica de remoção cirúrgica e da abordagem radioterapêutica (Dobson, 2011).

Novos tratamentos têm sido, igualmente, disponibilizados. Por exemplo, a terapia fotodinâmica tem sido usada no tratamento do carcinoma de células escamosas superficial do gato; e novos moduladores do sistema imunitário, com acção antiviral e antineoplásica simultânea, têm sido utilizados com sucesso no tratamento de carcinomas de células escamosas e linfoma epiteliotrópico (Dobson, 2011).

#### **2.4.1. Quimioterapia**

A quimioterapia é uma modalidade terapêutica muito comum em medicina veterinária, quer seja usada isoladamente ou como terapêutica adjuvante de cirurgia e radioterapia. Novos fármacos, novas associações e novos protocolos estão constantemente a ser estudados e aplicados. Apesar de a quimioterapia ser normalmente bem tolerada pelos nossos animais, existe a possibilidade de ocorrência de efeitos secundários e reacções adversas, que serão referidos posteriormente.

A quimioterapia está indicada no tratamento de neoplasias quimiosensíveis, como neoplasias hematopoiéticas (linfoma, leucemia, mieloma múltiplo) e neoplasias com alta probabilidade de metastização (osteossarcoma, hemangiossarcoma). Para que um fármaco antineoplásico seja eficaz, ele deve atingir a célula em questão e exercer um efeito tóxico sobre a mesma. Para isso, a célula deve ser susceptível ao fármaco (deve estar numa fase activa do ciclo celular) e não ter desenvolvido resistência.

O mecanismo de acção de um fármaco antineoplásico pode ser específico ou não-específico de fase do ciclo celular. Isto é, os fármacos citotóxicos podem danificar o ADN, inibindo a replicação celular e/ou induzindo a apoptose, ou interferir com uma fase específica do ciclo celular, como a mitose, prevenindo que esta se complete (Chun, Garrett & Vail, 2007). Células em divisão activa são mais sensíveis a lesões do ADN e a alterações dos processos celulares, pelo que a quimioterapia é mais eficaz em tumores de elevado índice mitótico (Chun et al., 2007).

Os fármacos antineoplásicos podem ser utilizados isoladamente ou em combinação com outros. Os protocolos de fármaco único têm a vantagem de serem mais baratos, acarretarem menor risco de toxicidade e de serem necessárias menos visitas ao veterinário.

Por outro lado, apresentam menor eficácia e maior probabilidade de desenvolvimento de resistência que os protocolos de associação de fármacos. Estes últimos, no entanto, são mais dispendiosos, apresentam maior risco de toxicidade e exigem uma maior disponibilidade por parte dos proprietários (consultas repetidas, maior monitorização) (Vail, 2011). Nos protocolos de associação de fármacos é realizada a rotação de agentes com diferentes propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, o que impede a toxicidade acumulada num único órgão e cada um deles deve exercer alguma eficácia isolada sobre a neoplasia. Devem, contudo, ser usadas as doses máximas sempre que possível e associar-se fármacos com diferentes mecanismos de acção sobre as células neoplásicas de forma a maximizar o número de células mortas. A dose apropriada para qualquer fármaco deve então ser a máxima tolerada, administrada a intervalos de tempo curtos, mas de forma a manter os níveis de toxicidade aceitáveis. Os fármacos antineoplásicos são normalmente doseados com base na área de superfície corporal (ASC), em metros quadrados (m<sup>2</sup>). No Anexo I - Tabela 10 é apresentada uma tabela de conversão de peso vivo em ASC para cães e gatos.

### **3. Linfoma canino**

O linfoma (linfoma maligno ou linfossarcoma) inclui um grupo variado de neoplasias que têm em comum a sua origem em células linfocitárias. Geralmente, desenvolve-se em tecidos linfóides, como linfonodos, baço e medula óssea podendo, contudo, ter origem em quase todos os tecidos do organismo, incluindo tecidos não linfóides (Vail & Young, 2007).

#### **3.1. Incidência**

O linfoma é uma das neoplasias mais frequentes no cão, sendo a principal neoplasia hematopoiética da espécie (Vail & MacEwen, 2000). Afecta cães de qualquer género, geralmente animais mais velhos, com idade média de 6 a 9 anos. O linfoma pode ocorrer em qualquer raça, mas um estudo realizado no Reino Unido sugere a existência de uma predisposição em Boxers, Bull Mastiffs, Basset Hounds, São Bernardos, Scottish Terriers, Airedale Terriers e Bulldogs (Edwards, Henley, Harding, Dobson & Wood, 2003). A incidência anual desta neoplasia tem vindo a aumentar ao longo dos anos, sendo semelhante à do linfoma humano (Vail & MacEwen, 2000).

#### **3.2. Etiologia**

Tal como outras neoplasias, o linfoma tem uma etiologia multifactorial. As causas mais importantes incluem factores genéticos, infecciosos, ambientais e imunodepressores.

No que se refere aos factores genéticos foi já reportada uma predisposição genética em Bull Mastiffs (Onions, 1984), estando envolvida uma mutação no gene supressor de tumores p53 (Veldhoen, Stewart, Brown & Milner, 1998; Nasir & Argyle, 1999). Alterações epigenéticas também têm sido investigadas em cães com linfoma, sendo a hipometilação do ADN uma característica das células neoplásicas da maioria dos casos de linfoma (Pelham, Irwin & Kay, 2003).

Relativamente aos factores infecciosos tem sido sugerido o envolvimento de retrovírus na patogénese do linfoma canino, tal como acontece na espécie felina (Tomley, Armstrong, Mahy & Owen, 1983). Paralelamente, pensa-se que pode existir uma associação entre a infecção por *Helicobacter sp.* e o desenvolvimento de linfoma gástrico, tal como acontece no Homem (Rossi et al., 1999).

Quanto aos factores ambientais, importa referir que, apesar de alguns estudos indicarem o contacto com certos herbicidas (como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético) como factor predisponente para o desenvolvimento de linfoma humano, os estudos realizados em animais não parecem suportar essa evidência (Garabrant & Phillbert, 2002). A residência em zonas industriais, a utilização de certos químicos (p.e.: tintas e solventes) pelos proprietários e a exposição a campos magnéticos também necessitam de ser investigados com maior rigor, quanto à possibilidade de aumentar o risco de linfoma em cães expostos a estes factores (Vail & Young, 2007).

Por último, uma função imunitária comprometida tem sido encontrada em cães com linfoma (Keller, 1992; Blackwood, German, Stell & O'Neill, 2004). Em medicina humana, o primeiro factor de risco encontrado para o desenvolvimento de linfoma foi a imunodepressão em pacientes transplantados, que necessitam de terapêutica imunodepressora para evitar rejeições (Penn, 1974, 1990). Tipicamente, estas terapêuticas utilizavam prednisolona e azatioprina, mas a introdução de ciclosporina foi associada a um aumento do número de casos descritos. Em medicina veterinária, foi reportado um caso de aparecimento de linfoma multicêntrico num Pastor Alemão, quatro semanas após o tratamento de fístulas e úlceras perianais com ciclosporina e cetoconazol (Blackwood et al., 2004).

### **3.3. Classificação**

A classificação do linfoma canino pode ser feita com base na localização anatómica, bem como em critérios histológicos, citológicos e imunofenotípicos (Vail & Young, 2007).

#### **3.3.1. Classificação anatómica**

As formas anatómicas mais comuns, por ordem decrescente de prevalência, são: linfoma multicêntrico, linfoma gastrointestinal (GI) ou alimentar, linfoma cutâneo e linfoma mediastínico. Menos frequentemente são ainda observadas formas extranodais (fora do sistema linfático) que afectam o olho, o sistema nervoso central (SNC), o osso, os testículos, a bexiga, o coração e a cavidade nasal (Vail & Young, 2007; Vail, 2011).

As características clínicas e os diagnósticos diferenciais de cada uma das formas referidas encontram-se resumidas no Anexo II - Tabela 11.

#### **3.3.2. Classificação histológica e imunofenotípica**

Os linfomas originam-se a partir da clonagem de células linfóides com características imunofenotípicas e morfológicas variadas. Muitos sistemas histológicos têm sido utilizados para classificar os linfomas não-Hodgkin em medicina humana, sendo alguns deles empregues igualmente em medicina veterinária (ex.: WHO, REAL, Kiel) (Vail, 2011). O novo sistema da OMS, que classifica o linfoma humano de acordo com critérios morfológicos, fenotípicos, genéticos e moleculares, é o actualmente utilizado na classificação do linfoma canino (Campo et al., 2011). Neste sistema, os linfomas são classificados em baixo e alto grau de malignidade (Lymphoma Association, 2011). Os linfomas de baixo grau de malignidade (linfomas indolentes) são geralmente constituídos por pequenas células linfocíticas com baixo índice mitótico e, como tal, de progressão lenta. Embora sejam tumores menos responsivos à quimioterapia, estão associados a tempos médios de vida (TMV) longos. Pelo contrário, os linfomas de alto grau de malignidade (linfomas agressivos) são constituídos por grandes células linfoblásticas de elevado índice mitótico, progredindo mais rapidamente. Apresentam, contudo, melhor resposta à quimioterapia (Teske et al.,

1994; Lymphoma Association, 2011). Tal como o que se verifica no linfoma humano, o linfoma canino pode ainda ser classificado de acordo com o tipo de linfócitos que o constitui (fenótipo). Por isso, existem linfomas de células B, linfomas de células T e os designados linfomas de células *null* (i.e., que não apresentam reactividade, nem para os receptores dos linfócitos T, nem para os de linfócitos B). Esta classificação é importante para o prognóstico (Fan, 2003). De facto, cães com linfoma de células T apresentam uma menor taxa de resposta à quimioterapia, períodos de remissão e TMV mais curtos do que cães com linfomas de células B (Appelbaum et al., 1984; Teske et al., 1994; Ruslander, Gebhard, Tompkins, Grindem & Page, 1997). Além disso, estes linfomas tendem a estar associados a hipercalcémia, que também representa um factor de prognóstico negativo. Em medicina veterinária, 60-80% dos casos de linfoma são linfoma de células B, 10-38% são linfoma de células T, 22% são linfomas mistos (constituídos por linfócitos B e T) e menos de 5% são linfomas de células *null* (Appelbaum et al., 1984; Teske et al., 1994; Ruslander et al., 1997; Modiano et al., 2005). Assim, é importante determinar o grau histológico dos linfomas caninos e realizar a sua imunofenotipagem, que será referida posteriormente. Este fenótipo também parece obedecer a uma predisposição racial (Modiano et al., 2005).

#### **3.4. Apresentação, sinais clínicos e síndromes paraneoplásicas**

Os sinais clínicos associados ao linfoma canino são variáveis e dependem da extensão e localização da neoplasia (Anexo II: Tabela 11). No entanto, a apresentação típica é a de uma linfadenopatia generalizada (Vail, 2011). Apresentações menos comuns incluem casos limitados ao baço e/ou fígado (linfoma hepatoesplénico), caracterizando-se por ausência de linfadenopatia periférica e infiltração do fígado, baço e medula óssea, geralmente com linfócitos T (Vail & Young, 2007).

O linfoma canino pode também estar associado a síndromes paraneoplásicas. As síndromes paraneoplásicas resultam dos efeitos indirectos das neoplasias, devido à produção e libertação de substâncias biologicamente activas como hormonas, factores de crescimento e citocinas (Vail, 2011). No linfoma canino, a principal síndrome paraneoplásica é uma anemia de doença crónica, caracterizada pela diminuição do tempo de semi-vida dos eritrócitos. Geralmente, trata-se de uma anemia não regenerativa ligeira/moderada, normocítica e normocrómica (Vail & Young, 2007), mas pode também ocorrer anemia hemolítica.

Para além da anemia é também frequente a ocorrência de hipercalcémia em cães com linfoma (Vail, 2011). De facto, ela ocorre em 10-40% dos casos e é mais comum na forma mediastínica (Vail & Young, 2007). Clinicamente, a hipercalcémia é caracterizada por anorexia, perda de peso, fraqueza muscular, letargia, poliúria (PU), polidipsia (PD) e, mais raramente, depressão do SNC ou coma. A hipercalcémia está normalmente associada à produção ectópica de uma substância do tipo hormonal, um péptido com estrutura e função

semelhantes à paratormona (*paratormone related peptide* - PTH-rP), que é produzido pelas células neoplásicas (geralmente células T) (Rosol et al., 1992). Assim, a presença de hipercalcemia pode auxiliar o diagnóstico e servir como marcador da resposta à terapêutica. Outras síndromes paraneoplásicas associadas ao linfoma incluem gamopatias monoclonais, neuropatias e caquexia, sendo também frequente a ocorrência de neutropenia (Vail & Young, 2007). A neutrofilia pode ser observada em 25-40% dos cães com linfoma, sendo a linfocitose pouco comum (20% dos casos). A trombocitopenia pode ser encontrada em 30-50% dos casos, mas as hemorragias espontâneas raramente constituem um problema (Vail, 2011).

### **3.5. Abordagem clínica: diagnóstico e estadiamento**

Em todos os cães com suspeita de linfoma, independentemente da localização anatômica, o diagnóstico deve incluir a realização de: (1) um exame clínico minucioso, incluindo palpação dos linfonodos, palpação abdominal e auscultação cardio-pulmonar; (2) um hemograma completo para pesquisa de anemia e outras alterações hematológicas referidas anteriormente, bem como pesquisa de linfócitos atípicos circulantes; (3) um perfil bioquímico básico (incluindo cálcio total ou ionizado) para pesquisa do envolvimento dos órgãos internos e hipercalcemia; (4) e urianálise para determinação da função renal (Vail & Young, 2007). Para a avaliação do envolvimento dos órgãos internos estão ainda indicados exames como a radiografia torácica e a ecografia abdominal.

O exame morfológico dos tecidos e células tumorais é também essencial para o diagnóstico de linfoma. Embora a análise citológica de uma PAAF seja normalmente suficiente para fazer um diagnóstico definitivo de linfoma, a biópsia dos linfonodos é preferível para a classificação histológica e imunofenotipagem (Vail, 2011). Num linfonodo saudável existem 75-95% de linfócitos pequenos, 5-15% de linfócitos médios e cerca de 5% de linfócitos de grandes dimensões (linfoblastos), juntamente com plasmócitos, mastócitos, neutrófilos e macrófagos. Estas proporções são variáveis de acordo com o processo em desenvolvimento (inflamação, neoplasia). Na maioria dos linfomas a quantidade de linfoblastos é superior a 50% das células linfóides, sendo o linfoma linfocítico (de linfócitos pequenos) mais raro (Cowell, Dorsey & Meinkoth, 2003). É também importante diferenciar o linfoma de uma hiperplasia reactiva. Se possível, o diagnóstico deve ser feito através de amostras de linfonodos periféricos, evitando-se assim biópsias percutâneas do baço ou fígado. Contudo, se não existir envolvimento de linfonodos periféricos, devem colher-se amostras de tecidos envolvidos da cavidade abdominal (fígado, baço e linfonodos abdominais) através de biópsias/PAAFs ecoguiadas (Vail, 2011). As técnicas referidas são as mais simples e práticas de realizar, contudo, a classificação do linfoma quanto ao grau de malignidade é mais rigorosa quando feita através de cortes histológicos, pelo que deve ser extraído um linfonodo inteiro, incluindo a cápsula (Vail & Young, 2007).

Após obtenção de um diagnóstico definitivo, a extensão da doença deve ser determinada e correlacionada com o seu estadiamento clínico. O sistema de estadiamento da OMS é a ferramenta normalmente usada para o estadiamento do linfoma canino e encontra-se ilustrado na Tabela 2. Mais de 80% dos cães são apresentados à consulta em estadios avançados (estadio III ou IV) (Vail & Young, 2007).

Para estadiar um linfoma é necessário avaliar o envolvimento dos linfonodos, órgãos internos e medula óssea. Assim, está indicada PAAF ou biópsia de medula óssea. Apesar de a avaliação da medula óssea fornecer informação prognóstica importante, o facto de a terapêutica se basear sempre em protocolos muito semelhantes (como descrito posteriormente) faz com que, até há poucos anos, ela fosse considerada desnecessária no caso de o proprietário optar pelo tratamento, independentemente do estadio da doença. No entanto, foi recentemente reportada uma alteração eficaz no tratamento de linfoma canino com envolvimento medular (Marconato et al., 2008), o que confere à avaliação da medula óssea uma nova e reforçada importância.

Como referido anteriormente, a realização de radiografias torácicas e ecografias abdominais é importante na determinação da extensão do envolvimento interno. Exames imagiológicos mais avançados como TC e RM também se podem revelar informativos.

**Tabela 2:** Sistema de estadiamento da OMS para linfoma (adaptado de Vail & Young, 2007)

<b>Estadio</b>	<b>Critérios</b>
<b>I</b>	Envolvimento de apenas um linfonodo a. Sem sinais clínicos da doença b. Com sinais clínicos da doença
<b>II</b>	Envolvimento dos linfonodos regionais a. Sem sinais clínicos da doença b. Com sinais clínicos da doença
<b>III</b>	Linfadenopatia generalizada a. Sem sinais clínicos da doença b. Com sinais clínicos da doença
<b>IV</b>	Envolvimento do fígado e/ou baço (com ou sem estadio III) a. Sem sinais clínicos da doença b. Com sinais clínicos da doença
<b>V</b>	Envolvimento da medula óssea ou sangue e/ou órgãos não linfóides (com ou sem estadios I-IV) a. Sem sinais clínicos da doença b. Com sinais clínicos da doença

### 3.5.1. Imunofenotipagem e clonagem celular

A imunofenotipagem é uma técnica utilizada para determinar o tipo de células que constituem o linfoma. O fenótipo de um linfócito é identificado pela determinação da expressão de moléculas específicas de células B (CD79a, CD20, CD21, IgM, IgG) e T (CD3, CD4, CD5, CD8) (Gelain & Comazzi, 2011). Para isso, anticorpos monoclonais contra estes

marcadores linfocitários são aplicados a cortes histológicos (imunohistoquímica), citologias (imunocitoquímica), ou células individuais (citometria de fluxo - CF).

Por vezes, o diagnóstico de linfoma não é possível através de critérios puramente histológicos e citológicos. Nesses casos, podem ser vantajosas técnicas moleculares mais avançadas. Por exemplo, quando tecidos suspeitos, linfócitos circulantes ou líquidos de efusão incluem uma população de células mista ou não discriminam totalmente entre proliferações de linfócitos malignas ou benignas, pode ser útil a realização de imunofenotipagem através de CF ou provas de clonagem celular (Vail, 2011).

A CF, técnica muito utilizada em medicina humana, não só permite a fenotipagem do linfoma, como a determinação do grau de maturidade das suas células. De facto, esta técnica permite identificar neoplasias de células precursoras (leucemia aguda) ou de células maduras (linfoma e leucemia crónica). Esta diferenciação é feita através da identificação da molécula CD34, expressa na membrana de precursores mielóides e linfóides, mas ausente nas células que abandonam a medula óssea (Gelain & Comazzi, 2011). A CF tem a vantagem de permitir a caracterização simultânea de um elevado número de células. Contudo, a sua aplicação em medicina veterinária é ainda limitada.

A capacidade de produzir clones constitui a base da malignidade. Uma população de células malignas é, em teoria, derivada da proliferação de um único clone maligno, caracterizado por uma região de ADN específica desse tumor. Por exemplo, num linfoma de células T, todas as células malignas devem conter a mesma sequência de ADN na região que codifica os receptores das células T. Da mesma forma, num linfoma de células B, todas as células malignas devem ter sequências de ADN idênticas na região que codifica a imunoglobulina (Ig) receptora. Pelo contrário, numa linfocitose reactiva benigna, as células são policlonais, pelo que possuem receptores de antigénios (Ag) diferentes. Com base neste conhecimento, vários investigadores têm usado técnicas de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para amplificar estas regiões de forma a caracterizar a população de linfócitos envolvidos (Avery & Avery, 2004).

Para além de auxiliarem o diagnóstico, estas técnicas moleculares podem ser úteis na determinação precoce de recidivas e no estadiamento clínico.

### **3.6. Prognóstico**

Após estabelecimento do diagnóstico, cães não submetidos a tratamento vivem, geralmente, 4-6 semanas, embora animais com tumores de baixo grau de malignidade possam viver mais tempo (Vail, 2011). Inicialmente, o maneio do linfoma é muito positivo, com taxas de resposta a atingir os 90% em animais tratados com quimioterapia de associação de fármacos. O TMV ronda os 12 meses após tratamento adequado, sendo que cerca de 25% dos animais sobrevivem pelo menos dois anos. Além disso, a percepção dos proprietários no que se refere à qualidade de vida do seu animal durante o tratamento, é geralmente

satisfatória (Bronden, Rutteman, Flagstad & Teske, 2003). Infelizmente, muitos animais sofrem recidivas.

O linfoma é uma doença tipicamente sistêmica pelo que requer uma abordagem terapêutica sistêmica (como a quimioterapia). Algumas exceções incluem casos de linfoma solitário nodal ou extranodal, onde inicialmente se aconselham terapêuticas localizadas (como cirurgia ou radioterapia) (Vail, 2011). Apesar das elevadas taxas de remissão actualmente conseguidas, novas alternativas terapêuticas continuam a ser estudadas, já que se tem revelado difícil aumentar a fasquia dos 12 meses de TMV.

O prognóstico do linfoma canino é então variável, dependendo de uma série de factores. Os dois factores com maior correlação com o prognóstico são o fenótipo e o subestadio baseado na classificação da OMS (Vail & Young, 2007). Muitos estudos têm confirmado que cães com linfomas imunoreactivos para CD3 (característicos de linfócitos T) apresentam remissões e TMV mais curtos (Appelbaum et al., 1984; Teske et al., 1994; Ruslander et al., 1997). Da mesma forma, cães com subestadio *b* (i.e., com sinais clínicos) têm tendência a responder menos à quimioterapia apresentando TMV inferiores aos conseguidos no linfoma de subestadio *a*.

Outros factores incluem (1) o estadio da OMS, sendo que cães em estadio I ou II apresentam um melhor prognóstico do que cães em estadios mais avançados (III, IV e V); (2) critérios histopatológicos, sendo que linfomas de alto grau de malignidade estão associados a elevadas taxas de resposta mas menor TMV que linfomas com baixo grau de malignidade (Teske et al., 1994); (3) a existência de hipercalcémia (cálcio plasmático >11.9 mg/dl), que se revela um factor negativo, principalmente quando associada a linfomas de células T (Vail & Young, 2007); (4) a presença de anemia ou o envolvimento dos linfonodos mediastínicos craniais, que também diminui a probabilidade de resposta ao tratamento; (5) e ainda o tratamento prévio com esteróides, que aumenta a resistência da neoplasia aos restantes quimioterápicos (Vail, 2011). Finalmente, também a localização anatómica parece influenciar o prognóstico. Por exemplo, o linfoma cutâneo generalizado, o linfoma alimentar e o linfoma hepatoesplénico apresentam pior prognóstico que as restantes formas (Ruslander et al., 1997). Em alguns cães com linfoma pode existir envolvimento da medula óssea e linfócitos malignos circulantes no sangue periférico. Estes animais tendem igualmente a ter pior prognóstico.

### **3.7. Tratamento do linfoma canino**

A abordagem terapêutica em caso de linfoma depende do estadio e subestadio da doença, da presença ou ausência de síndromes paraneoplásicas, do estado clínico do paciente e de aspectos financeiros e de cumprimento das indicações do médico veterinário por parte dos proprietários. Com algumas exceções, o linfoma canino é considerado uma doença sistêmica e, como tal, requer uma terapêutica sistêmica de forma a atingir uma remissão

completa (RC) e um TMV alargado. Assim, a quimioterapia sistémica continua a ser a terapêutica de eleição para o linfoma canino (Vail & Young, 2007). Em geral, os protocolos de associação de fármacos têm uma eficácia superior relativamente a protocolos de fármaco único. Contudo, apesar da grande variedade de opções terapêuticas, é difícil atingir a cura, pelo que o principal objectivo passa por induzir uma RC, rápida e duradoura (indução), reinduzir a remissão no caso de ocorrerem recidivas (reindução) e, finalmente, induzir remissões quando a neoplasia deixa de responder aos fármacos iniciais, utilizando fármacos ausentes no protocolo original (resgate) (Marconato et al., 2013).

### **3.7.1. Protocolos de associação de fármacos**

Muitos protocolos quimioterápicos para cães com linfoma têm sido desenvolvidos durante os últimos 15 a 20 anos. Contudo, a maior parte dos protocolos de associação de fármacos utilizados em medicina veterinária são modificações do protocolo CHOP, inicialmente desenvolvido para tratamento do linfoma humano. O protocolo CHOP consiste numa combinação de ciclofosfamida (C), doxorrubicina (H – hidroxidaunorrubicina), vincristina (O – oncovin<sup>®</sup>) e prednisona/prednisolona (P). O protocolo original induz uma RC em cerca de 60-90% dos cães, com TMV de 6-12 meses (Vail & Young, 2007; Chun, 2009). A duração das respostas pode, no entanto, variar de acordo com a presença ou ausência dos factores de prognóstico discutidos anteriormente. Os cães que respondem à quimioterapia e atingem uma RC ficam normalmente livres de sinais clínicos associados ao linfoma, recuperando a qualidade de vida.

Tradicionalmente, os protocolos quimioterápicos para linfoma eram compostos por duas fases distintas: a indução e a manutenção. Durante a fase de indução, os tratamentos agressivos semanais eram administrados de forma a reduzir rapidamente o número de células malignas. Depois da indução, era utilizada uma terapêutica de manutenção, com menor frequência de administração, na tentativa de controlar o crescimento das células neoplásicas remanescentes (Fan, 2003). No entanto, a necessidade e eficácia desta terapêutica de manutenção tem sido posta em causa. De facto, ela tem-se mostrado ineficaz em humanos com linfoma Hodgkin, não-Hodgkin e mieloma múltiplo (Vail & Young, 2007). Actualmente, e após a realização de alguns estudos em cães (Chun, Garret & Vail, 2000; Garret, Thamm, Chun, Dudley & Vail, 2002), pensa-se que este período de manutenção não apresenta vantagens, sendo protocolos mais curtos e sem fase de manutenção os mais utilizados.

### **3.7.2. Protocolos de fármaco único**

Actualmente, os agentes mais eficazes contra o linfoma são a doxorrubicina, a L-asparaginase, a vincristina, a ciclofosfamida e a prednisona. Outros fármacos, considerados de segunda linha, incluem a vimblastina, a actinomicina-D, a mitoxantrona, o clorambucilo, o metotrexato e a lomustina (Vail & Young, 2007). No entanto, com a excepção da

doxorubicina, a indução com um fármaco único não resulta em remissões duradouras (Valerius, Ogilvie, Mallinckrodt & Getzy, 1997; Simon et al., 2008).

### **3.7.3. Reindução e resgate**

Embora se consigam elevadas taxas de remissão com os protocolos de associação de fármacos existentes e a qualidade de vida dos pacientes seja mantida durante o período de remissão, a maioria dos cães acaba por sofrer uma recidiva (Vail, 2011). Normalmente, isto representa a emergência de clones tumorais mais resistentes à quimioterapia, embora também possa ser consequência de dosagens e frequências de administração inadequadas ou falha em atingir elevadas concentrações de fármacos antineoplásicos em alguns locais, como o SNC (Vail & Young, 2007).

Quando a recidiva ocorre após a descontinuação do protocolo inicial, deve tentar-se a reindução com a reintrodução do mesmo protocolo (Garret et al., 2002). Neste caso, a probabilidade de uma segunda remissão continua alta (100% no estudo citado), embora a sua duração seja normalmente metade da primeira. Se a reindução falhar ou o animal não responder à indução inicial, deve ser tentada a introdução de fármacos/protocolos de resgate. Estes fármacos são agentes não utilizados nos protocolos originais, sendo introduzidos em caso de resistência (Ettinger, 2003). Vários protocolos de resgate têm sido descritos. Os mais comuns incluem protocolos de fármaco único ou associação de actinomicina D, mitoxantrona e doxorubicina (caso não tenha sido incluída no protocolo inicial); a associação de doxorubicina com dacarbazina; a lomustina, a L-asparaginase; e o protocolo de associação MOPP (M - mecloretamina, O - vincristina, P - prednisona e P - procarbazina) (Rassnick et al., 2002; Vail & Young, 2007).

### **3.7.4. Considerações finais**

Ao longo do tempo, vários protocolos de quimioterapia têm sido reportados na literatura veterinária, o que pode reflectir a incapacidade de atingir a cura na maioria dos casos.

O protocolo mais antigo usado em pacientes veterinários era um protocolo de associação com ciclofosfamida, vincristina, e prednisona (COP). Trata-se de um protocolo relativamente simples, tipicamente bem tolerado, resultando em taxas de RC de 60-70% e TMV de 6 a 7 meses (Vail & Young, 2007). No entanto, está actualmente estabelecido que os protocolos mais eficazes contra linfoma incluem a doxorubicina e são, essencialmente, variações do protocolo CHOP referido anteriormente (Hosoya et al., 2007). Apesar da maior parte destes protocolos CHOP incluir L-asparaginase, que pode ser iniciada em vários momentos do protocolo, vários estudos confirmam que a adição deste fármaco em protocolos de indução não resulta em aumentos significativos na taxa de remissão, da rapidez com que a mesma é atingida e da sua duração. Por isso, a utilização de L-asparaginase está reservada para situações de resgate (Jeffreys et al., 2005; MacDonald, Thamm, Kurzam, Turek & Vail, 2005).

#### 4. Quimioterapia e toxicidade

Como já foi referido, a maioria dos agentes e protocolos quimioterápicos utilizados em medicina veterinária são bem tolerados pelos animais. De facto, a maioria dos protocolos são delineados de forma a resultar em menos de 5% de hospitalizações e menos de 1% de mortalidade devidas à potencial toxicidade (Chun et al., 2007). Contudo, muitos quimioterápicos têm a capacidade de causar efeitos secundários agudos ou crónicos. Os fármacos mais frequentemente utilizados no tratamento do linfoma, bem como o seu mecanismo de acção, toxicidade e indicações terapêuticas estão listados no Anexo III - Tabela 12. Uma vez que estes fármacos exercem a sua acção sobre células em divisão activa, os efeitos secundários fazem-se sentir principalmente ao nível de sistemas e aparelhos que sejam constituídos por estas células, especialmente a medula óssea e o tracto gastrointestinal (TGI) (Lana & Dobson, 2011).

Geralmente, está indicada uma redução de 20% na dose de fármaco administrada, em caso de toxicidade GI e mielodepressão grave (<500 neutrófilos/ $\mu$ L no momento do *nadir*, ou <2000/ $\mu$ L no momento da próxima sessão) (Chun et al., 2007). No entanto, reduções nas doses não devem ser encaradas com leveza, já que irão influenciar a eficácia do tratamento.

##### 4.1. Mielodepressão

A medula óssea é sensível aos efeitos tóxicos da quimioterapia devido ao seu elevado índice mitótico. Como os tempos de circulação e de semi-vida de cada linha celular formada na medula óssea são diferentes, geralmente começa por ocorrer neutropénia (menor tempo de semi-vida), seguida de trombocitopénia. A ocorrência de anemia é rara no cão e no gato (Lana & Dobson, 2011).

Embora comum, a neutropénia é geralmente moderada, não acarretando complicações clínicas. Contudo, uma neutropénia mais grave pode resultar em sépsis. O *nadir* da neutropénia ocorre 7-10 dias após a administração da maioria dos fármacos, pelo que a maioria dos protocolos estão desenhados de forma a permitir a recuperação da medula óssea entre administrações (Lana & Dobson, 2011). Não obstante, é aconselhada a monitorização dos pacientes com hemogramas completos antes de cada sessão de tratamento. De facto, os tratamentos devem ser adiados 5-7 dias caso a contagem de neutrófilos seja inferior 2000/ $\mu$ L (Chun et al., 2007). Importa ainda referir que animais com neutropénias graves podem não apresentar os típicos sinais de infecção devido à falta de células para montar uma resposta inflamatória. No entanto, podem apresentar letargia, anorexia e mau estado geral (Lana & Dobson, 2011).

A trombocitopénia também não tem, geralmente, importância clínica, não existindo perigo de hemorragias. Caso a contagem de plaquetas seja inferior a  $50 \times 10^3$ / $\mu$ L, a administração de fármacos com efeitos medulares deve ser adiada até recuperação das contagens (Lana & Dobson, 2011).

No caso de a citopenia ser secundária à neoplasia (e não à toxicidade dos fármacos administrados), o tratamento deve ser continuado até que as contagens celulares voltem ao normal. Além disso, a maioria dos efeitos secundários dos protocolos antineoplásicos são auto-limitantes, não necessitando de intervenção médica.

A administração profiláctica de antibióticos está indicada em animais com mielodepressão, principalmente na presença de sinais clínicos e/ou febre, bem como a pesquisa de possíveis fontes de infecção (Chun et al., 2007).

#### **4.2. Toxicidade gastro-intestinal**

Tal como a medula óssea, também o TGI é constituído por células em constante renovação. Como tal, a toxicidade GI é um dos efeitos secundários mais frequentemente observados. Em medicina veterinária, a maioria dos quimioterápicos causa emese retardada (24-48h após administração) (Lana & Dobson, 2011).

Outros sinais GI incluem anorexia e diarreia, que podem resultar da destruição directa das células do epitélio intestinal. Neste caso, pode ocorrer translocação bacteriana e sépsis (principalmente se o animal já apresentar neutropénia) (Lana & Dobson, 2011).

Como consequência dos efeitos GI pode ainda ocorrer depressão, desidratação e desequilíbrios electrolíticos. Para tentar controlar esta situação podem ser administrados antieméticos como metoclopramida, ondansetron ou maropitant (Lana & Dobson, 2011).

#### **4.3. Outros efeitos tóxicos**

Embora se trate de uma situação rara e sem significado clínico, é possível a ocorrência de alopecia ou atrasos no crescimento do pêlo (Lana & Dobson, 2011).

Alguns quimioterápicos têm acção vesicante, podendo causar irritação ou necrose tissular em caso de extravasão (ex.: vincristina, vimblastina, doxorubicina). A gravidade da reacção depende do fármaco e da quantidade extravasada (Lana & Dobson, 2011).

Os fármacos que mais frequentemente causam reacções alérgicas são a L-asparaginase e a doxorubicina, devendo os animais ser cuidadosamente observados durante e após a administração destes quimioterápicos. No cão, os sinais clínicos de hipersensibilidade incluem urticária, eritema, excitação, vômito e edema das pálpebras e lábios. Reacções graves podem levar a hipotensão e colapso circulatório (Lana & Dobson, 2011).

A toxicidade cardíaca, que pode ser aguda ou crónica, está geralmente associada à administração de doxorubicina no cão. A forma aguda manifesta-se por arritmias transitórias que ocorrem durante ou imediatamente após a administração do fármaco. A forma crónica é mais comum e pode resultar numa cardiomiopatia dilatada e possível insuficiência cardíaca congestiva irreversível (Lana & Dobson, 2011).

A cistite hemorrágica estéril é uma possível complicação da administração crónica de ciclofosfamida no cão. Os sinais clínicos incluem hematúria, disúria e polaquiúria (Lana &

Dobson, 2011). Para prevenir a ocorrência deste tipo de cistites é aconselhável a administração de furosemida (2,2 mg/kg) antes da administração de ciclofosfamida IV (Charney, Bergman, Hohenhaus & McKnight, 2003). A bexiga não é o único local do aparelho urinário que pode ser afectada, já que os rins constituem a principal via de eliminação para a maior parte dos fármacos antineoplásicos e seus metabolitos. No cão, os fármacos que mais frequentemente causam nefrotoxicidade são a cisplatina e o metotrexato (Lana & Dobson, 2011).

A neurotoxicidade associada à quimioterapia não é muito frequente nos nossos animais. No entanto, pode ocorrer como consequência da administração de vincristina, cisplatina e 5-fluorouracilo (Lana & Dobson, 2011).

Finalmente, a síndrome de lise tumoral (*Acute Tumour Lysis Syndrome* - ATLS) é uma emergência oncológica que resulta da lise rápida de células malignas em resposta à quimioterapia. Durante este processo ocorre libertação de produtos intracelulares e, como consequência, a quantidade de iões em circulação excede a capacidade excretora dos rins. Ocorrem, por isso, desequilíbrios electrolíticos graves, potencialmente fatais (hipercalémia, hiperfosfatémia, hipocalcémia, acidose metabólica). Adicionalmente, a morte massiva de células neoplásicas provoca a libertação de purinas, resultando na acumulação de ácido úrico, que pode provocar insuficiência renal aguda. Em medicina humana, esta complicação está normalmente associada a neoplasias hematológicas/hematopoiéticas (linfoma, leucemia), sendo rara em tumores sólidos (Altman, 2001). Em medicina veterinária, a ATLS é rara, mas já foi descrita em animais com linfoma. Os sinais clínicos incluem depressão, bradicardia, vômito, diarreia, colapso cardiovascular e choque (Lana & Dobson, 2011).

## **5. Imunodepressão**

Os vários constituintes do sistema imunitário (linfócitos T, linfócitos B, células fagocitárias e sistema de complemento) apresentam uma estreita cooperação que confere protecção contra infecções bacterianas, virais ou fúngicas. Por isso, qualquer situação que resulte na ausência/deficiência de um dos seus componentes pode potencialmente resultar no comprometimento da função imunitária, predispondo ao aparecimento destas infecções.

Embora seja possível uma imunodepressão global (em que todos os componentes do sistema imunitário são afectados), é mais comum que se verifique uma alteração limitada a um dos componentes (Lydyard, Whelan & Fanger, 2000). De um modo geral, alterações no número e função dos linfócitos T predispoem o indivíduo para infecções causadas por agentes intracelulares, como vírus e alguns fungos, enquanto alterações nos linfócitos B, fagócitos e complemento predispoem para infecções causadas por agentes extracelulares, como a maioria das bactérias (ex.: *Pneumococcus*, *Streptococcus* e *Haemophilus*). Contudo, uma deficiência nas células T tem geralmente complicações mais graves já que, para além do compromisso da imunidade celular, é frequente a alteração simultânea da imunidade humoral, conseqüente da estreita interacção e cooperação entre os dois sistemas. Assim, estes indivíduos apresentam infecções graves e recorrentes por vírus, fungos, bactérias e protozoários (Lydyard et al., 2000).

Várias podem ser as situações envolvidas no comprometimento da função imunitária, tais como factores genéticos, neoplasias e seus tratamentos, má nutrição e idade (Lydyard et al., 2000). Deste modo, as imunodeficiências classificam-se em primárias e secundárias. A imunodeficiência primária é congénita e resulta de uma falha no correcto desenvolvimento do sistema imunitário; a imunodeficiência secundária é uma condição adquirida, conseqüente a outras doenças e seus tratamentos, sendo a forma mais frequente.

### **5.1. Imunodepressão em pacientes oncológicos**

Um dos temas mais debatidos em medicina humana consiste na imunodepressão em pacientes oncológicos quer devido à própria doença, quer devido aos fármacos administrados para o seu controlo. Esta combinação faz com que estes pacientes comportem um elevado risco de desenvolvimento de infecções oportunistas graves.

#### **5.1.1. Imunodepressão em oncologia humana**

A questão da imunodepressão associada às neoplasias e suas terapêuticas começou a ser abordada há várias décadas, existindo numerosos artigos publicados sobre o assunto.

Nesta perspectiva, as neoplasias hemotopoiéticas são as mais intensamente estudadas, tendo a leucemia linfoblástica aguda (LLA) merecido especial interesse, uma vez que constitui uma das doenças malignas mais comuns em pediatria.

As propriedades imunodepressoras de fármacos citotóxicos foram reconhecidas pela primeira vez em 1921, quando se verificou que o gás mostarda induzia leucopénia em humanos, cães e coelhos, inibindo ainda a actividade dos anticorpos (Ac) de coelho contra eritrócitos de ovelha (Hektoen & Corper, 1921).

Um estudo efectuado em crianças com LLA avaliou os efeitos de um protocolo quimioterápico na imunidade celular, em diferentes fases do tratamento. Antes do início do tratamento de manutenção verificou-se que a média da contagem absoluta de linfócitos T (CD3+, CD4+ e T CD8+), linfócitos B (CD19+), e células *natural killer* (NK) (CD3-/CD16+) era muito inferior à de indivíduos saudáveis. Contudo, a percentagem dos vários linfócitos e o rácio CD4+/CD8+ eram semelhantes às dos indivíduos saudáveis, sugerindo que a diminuição destes parâmetros se faz de maneira uniforme. No final do protocolo de manutenção observou-se uma diminuição do rácio CD4+/CD8+ e das células NK, enquanto que o número e percentagem de linfócitos B aumentou. Os dois últimos parâmetros recuperaram valores normais duas semanas após o final desta terapêutica. Neste estudo, após o tratamento de manutenção, os pacientes com leucemia apresentaram uma diminuição grave da produção de interleucina 2 (IL-2) (quer por um efeito directo dos fármacos, quer pela diminuição do número de linfócitos T) e uma diminuição na citotoxicidade mediada por células NK. Por outro lado, a produção de factor de necrose tumoral alfa (*Tumor necrosis factor alfa* – TNF $\alpha$ ) e a actividade contra células resistentes às células NK revelaram um aumento que parece compensar a diminuição da IL-2. Desta forma, os autores concluíram que a administração de fármacos quimioterápicos pode provocar alterações na citotoxicidade mediada por células, na produção de citocinas, no número de linfócitos e suas sub-populações e no total de células mononucleadas (Komada et al., 1992). A consciencialização do impacto que o tratamento antineoplásico tem no sistema imunitário e a necessidade de minimizar os riscos a ele inerentes, têm contribuído para o desenvolvimento de terapêuticas adjuvantes, como a administração de factores estimuladores de colónias de granulócitos (G-CSF – *granulocyte colony-stimulating factor*) para acelerar a recuperação do sistema imunitário (Kubota, Ohji, Itoh, Sasagawa & Nakada, 2001), a administração de IL-2 para estimular a proliferação de linfócitos T e células NK, ou a aplicação de terapia antiretroviral intensa (*Highly Active Antiretroviral Therapy* - HAART) para evitar o aumento da carga viral em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus* - HIV), quando tratados com doses padrão de quimioterápicos (Simonelli et al., 2003).

### **5.1.2. Imunodepressão em oncologia veterinária**

Apesar da grande quantidade de estudos efectuados em medicina humana, no que se refere à influência dos fármacos antineoplásicos no sistema imunitário, o mesmo não se verifica em medicina veterinária. Contudo, a necessidade de avaliar esta influência nos nossos

animais é crescente, não só na perspectiva de uma oncologia comparada, mas também pelo facto de a quimioterapia, actualmente, se tratar de uma realidade em medicina veterinária.

Um dos primeiros estudos foi realizado em 1974 por Weiden e colaboradores. Os autores realizaram vários testes imunológicos em cães com diversas neoplasias, antes do início do tratamento. Dos cães estudados, 62 apresentavam linfoma e 35 apresentavam tumores sólidos (ex.: sarcomas, carcinomas, mastocitomas). Quando comparados com animais saudáveis, os títulos de IgG e a resposta humoral após imunização com eritrócitos de ovelha eram significativamente inferiores em cães com linfoma, mas não em cães com tumores sólidos. Ambos os grupos desenvolveram Ac contra enxertos de pele de dadores incompatíveis, embora os animais com linfoma tenham demorado mais tempo a rejeitá-los, o que reflecte algum compromisso da imunidade celular. A resposta à tuberculina e a blastogénese *in vitro* foram deficientes em ambos os grupos. A função do sistema reticuloendotelial (SRE), avaliada através da eliminação de bacteriófagos da circulação, estava comprometida em cães com linfoma e normal em cães com tumores sólidos. Assim, os autores concluíram que animais com linfoma apresentam uma marcada diminuição da função imunológica (humoral e celular) e do SRE, enquanto que cães com tumores sólidos exibem uma imunidade humoral e função do SRE intactas, embora se verifique uma diminuição parcial da imunidade celular. Os resultados obtidos sugerem então que o tipo e o grau de imunodepressão existentes em pacientes oncológicos se devem, pelo menos parcialmente, ao próprio tumor (Weiden et al., 1974).

Uma publicação de 2006 tentou caracterizar o efeito dos glucocorticóides na expressão dos marcadores fenotípicos dos linfócitos (Ammersbach, Kruth, Sears & Bienzle, 2006). Como se sabe, os glucocorticóides reduzem a inflamação e a resposta imunitária através da interferência na produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão importantes para a função leucocitária. Os efeitos deste grupo de fármacos são variáveis consoante a dose administrada, pelo que são tipicamente utilizados em cães com doenças inflamatórias, autoimunes ou neoplásicas (incluindo linfoma). Neste estudo, o tratamento de cães saudáveis com prednisolona resultou numa diminuição significativa das percentagens de linfócitos CD3, CD4, CD21, CD45RA e CD90; e numa diminuição dos linfócitos CD18 e CD45. Por outro lado, a cultura dos linfócitos em prednisolona resultou numa redução significativa da expressão de todos os marcadores linfocitários e na fragmentação do ADN. Assim, os autores concluíram que a administração de glucocorticóides em dose imunodepressora diminui significativamente a expressão dos marcadores fenotípicos dos linfócitos caninos e induz a sua apoptose *in vitro*. Estas alterações podem então constituir um dos mecanismos de acção para a imunodepressão induzida por glucocorticóides (Ammersbach et al., 2006).

Recentemente foi realizado um estudo em Portugal (Lima, 2011) com o objectivo de avaliar a influência da administração de fármacos citotóxicos no sistema imunitário de canídeos com diferentes tipos de neoplasias. Neste estudo foram avaliados vários parâmetros, incluindo a presença de parvovírus canino (*Canine parvovirus* – CPV) no sangue (plasma e células) e fezes, e o título de Ac plasmáticos para o CPV, antes do início do tratamento e no momento da 3ª sessão de quimioterapia. A detecção de CPV apenas aumentou em 11% dos casos (correspondente a 1 animal), tendo-se mantido em 67% dos casos (6/9) e diminuído em 22% dos casos (2/9). Na 3ª sessão, nenhum dos animais estava a excretar vírus nas fezes e apenas um desenvolveu virémia. Relativamente ao hemograma, apenas se detectaram diminuições significativas nos leucócitos e eosinófilos. Apesar da detecção de CPV em alguns animais, estes foram considerados imunocompetentes por não exibirem sinais clínicos de doença. Assim, apenas um animal manifestou sinais clínicos potencialmente sugestivos de algum grau de imunodepressão. Dos 9 animais estudados, apenas 1 não tinha um estatuto vacinal conhecido. Os restantes estavam vacinados para o CPV e nenhum deles foi vacinado durante o tratamento. O título de Ac contra o CPV aumentou em 56% dos animais (5/9) e manteve-se em 33% dos casos (3/9), tendo diminuído apenas num animal. A autora refere que os animais que aumentaram o título de Ac foram provavelmente expostos ao vírus durante as suas visitas ao hospital, sendo que revelaram uma manutenção da resposta humoral contra este agente (não se encontraram diferenças significativas no título de Ac entre as duas colheitas realizadas). Apesar de não se ter determinado se este título de Ac era protector, não foram encontradas diferenças significativas nos títulos de animais tratados e de animais saudáveis quer antes do início do tratamento, quer na 3ª sessão de quimioterapia. Embora a amostra utilizada tenha sido pequena e heterogénea e apenas se tenham analisado os vários parâmetros em dois momentos do tratamento, os resultados não parecem indicar a existência de imunodepressão ou comprometimento da resposta humoral, como consequência da administração de fármacos citotóxicos no tratamento de neoplasias em cães.

## **5.2. Infecções oportunistas em pacientes oncológicos**

Tal como referido anteriormente, as infecções oportunistas constituem uma das grandes preocupações em pacientes oncológicos. Não só estes pacientes estão sujeitos ao efeito imunodepressor das neoplasias e seus tratamentos, como frequentam ambientes propícios à contracção de certas infecções, como as hospitalares.

### **5.2.1. Infecções oportunistas em oncologia humana**

Durante muito tempo, a intensidade dos protocolos quimioterápicos foi limitada principalmente pela ocorrência de neutropénia e trombocitopénia. Contudo, tem-se verificado uma melhoria no manejo destes efeitos secundários e suas consequências, o que

permitiu aumentar a intensidade destes tratamentos quer por aumento das doses administradas, quer por diminuição da frequência de administração. Infelizmente, este aumento de intensidade impede que as populações de linfócitos recuperem entre administrações, o que pode resultar em complicações relacionadas com a imunocompetência.

Em 1975, Feldman e colaboradores concluíram que a varicela (causada pelo vírus varicela zoster – VZV) é mais grave em pacientes com neoplasias em tratamento do que em pacientes sem neoplasias ou em remissão; que a disseminação visceral desta doença é tanto mais comum, quanto menor for a contagem de linfócitos ( $<500/\mu\text{L}$ ); e que a interrupção da quimioterapia antes do aparecimento de lesões diminui a probabilidade de disseminação do vírus (Feldman, Wlater, Hughes & Daniel, 1975).

Já na década de oitenta, pacientes com linfoma Hodgkin não tratados apresentaram respostas linfocitárias *in vitro* para Ag do VZV diminuídas, quando comparados com os pacientes saudáveis. Da mesma forma, a produção de interferão nestes indivíduos revelou-se inferior à verificada em indivíduos saudáveis. Pacientes com linfoma Hodgkin submetidos a tratamento exibiram uma diminuição da resposta linfocitária, especialmente a celular. Este estudo confirma o papel do linfoma na imunodepressão, mesmo em indivíduos não sujeitos a terapêuticas imunodepressoras (Rasmussen & Arvin, 1982).

Em 1994, Mackall e seus colaboradores avaliaram a alteração do número de leucócitos em pacientes sujeitos a quimioterapia intensiva para várias neoplasias (incluindo linfoma não-Hodgkin). Embora tenham observado uma recuperação em mais de 50% nos valores de monócitos, neutrófilos e plaquetas entre cada ciclo de tratamento, o número de linfócitos não recuperou no mesmo período de tempo. Assim, os linfócitos B, T CD4+ e T CD8+ sofreram uma redução significativa durante a quimioterapia, sendo que os efeitos foram mais dramáticos em relação aos linfócitos T CD4+. As células NK sofreram igualmente uma diminuição ao longo do tratamento, embora não significativa. Neste estudo verificou-se ainda a ocorrência de várias infecções oportunistas. Três dos dez pacientes estudados desenvolveram infecções por adenovírus (pneumonia), histoplasmose pulmonar e herpes zoster após o final da quimioterapia. Todas estas ocorrências coincidiram com momentos de linfopenia T CD4+ persistente, tal como acontece em pacientes transplantados e portadores do HIV. Deste modo, apesar da amostra estudada ser demasiado pequena para correlacionar directamente as infecções oportunistas com o grau de linfopenia, os autores encontraram alterações quantitativas e qualitativas na imunidade celular, que parecem estar na base da ocorrência destas infecções. Este estudo sugere ainda que as células NK, sendo mais resistentes aos efeitos dos fármacos citotóxicos, possam agir como uma segunda linha de defesa contra estas infecções (Mackall et al., 1994).

Apesar de os tratamentos antineoplásicos provocarem uma linfopénia de células T profunda, a maioria dos pacientes não morre de infecções oportunistas. Embora tal se possa dever a uma profilaxia adequada e bons cuidados de suporte, estes pacientes parecem reter uma imunidade protectora contra infecções, por um processo que ainda não é bem conhecido. Para tentar desmistificar esta questão, Haining e seus colaboradores (2005) conduziram um estudo em crianças submetidas a quimioterapia para LLA, onde efectuaram a medição do número de linfócitos T efectores e de memória, avaliaram a função tímica e compararam os valores obtidos com os de um grupo controlo. A maioria dos pacientes apresentava diminuições profundas no número de linfócitos T CD4+ e CD8+ antes do início da quimioterapia, que não recuperaram durante os dois anos de tratamento. Das 73 crianças estudadas, 31 desenvolveram infecções oportunistas, sendo que cerca de 50% das infecções ocorreram durante o protocolo de indução. A produção de células imaturas pelo timo foi também inferior à do grupo controlo, contudo, os linfócitos T memória pré-existentes foram poupados, facto que parece ser responsável pela manutenção de uma imunidade protectora nestes pacientes (nenhuma das infecções foi fatal). Assim, os autores encontraram uma diminuição persistente no número de linfócitos T e na actividade tímica, quer devido à presença de LLA, quer devido ao seu tratamento. Além disso, os autores sugerem que as estratégias para induzir imunidade contra agentes patogénicos e contra a própria neoplasia serão mais eficazes se direccionados para a expansão de linfócitos T de memória pré-existentes (Haining et al., 2005).

Em 2009 foi reportado um caso de um paciente que contraiu uma infecção por *Bordetella bronchiseptica* após ter sido submetido a um transplante de células estaminais para o tratamento de linfoma. Neste paciente a infecção deveu-se ao contacto com o seu cão de 4 meses, diagnosticado com tosse do canil 2-3 semanas antes do início dos sintomas (Goldberg et al., 2009).

Outra das doenças que preocupa a comunidade científica em pacientes imunodeprimidos é a hepatite B. A reactivação desta doença pode ocorrer espontaneamente sendo, contudo, mais frequente como consequência de terapêuticas antineoplásicas imunodepressoras (ex., para linfoma ou leucemia), doenças autoimunes ou transplante de órgãos. Uma publicação recente recorda que a reactivação da hepatite B pode ser prevenida com a administração profilática de agentes antivirais, tal como acontece nos pacientes portadores do HIV submetidos a terapêuticas imunodepressoras (Hoofnagle, 2009).

Existe ainda outro problema sobejamente conhecido em pacientes imunodeprimidos. O *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA – *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) é um agente nosocomial cuja infecção causa elevadas taxas de morbidade e mortalidade nestes pacientes, especialmente aqueles que são sujeitos a tratamentos antineoplásicos. Por isso, mantém-se o problema de saber se pacientes com colonização ou infecção por MRSA (ou em risco de as desenvolver) devem prosseguir com a terapêutica

planeada ou, pelo contrário, devem atrasá-la ou reduzir as doses administradas. Numa publicação recente (Crysandt et al., 2010) os autores tentaram responder a esta questão, analisando o progresso clínico de pacientes com colonização ou infecção por MRSA sujeitos a quimioterapia para neoplasias sólidas e hematopoiéticas (incluindo linfoma não-Hodgkin). De 27 pacientes, 12 (44%) desenvolveram sépsis por MRSA, sendo que 42% das ocorrências se verificaram no momento em que a contagem de neutrófilos atingiu valores inferiores a 500/ $\mu$ L. Contudo, apenas 2 pacientes sucumbiram à infecção, o que corresponde a uma taxa de mortalidade de cerca de 17%. Após colonização por MRSA, a quimioterapia foi interrompida em 6 pacientes, sendo que 50% apresentaram caquexia e doença cardíaca grave. Apesar desta interrupção, um dos pacientes desenvolveu sépsis fatal por MRSA. Assim, os autores sugerem que a colonização/infecção por MRSA não é necessariamente dependente da intensidade da quimioterapia, pelo que não é obrigatória a redução das doses administradas ou o atraso/desistência do tratamento, principalmente em casos em que a intenção é curar o paciente. Nestes casos, a abordagem preferencial deve ser um tratamento antibacteriano apropriado.

Recentemente foi reportado um caso de herpes zoster num paciente submetido a terapêutica antineoplásica (Gopalan, Nair, Pillai & Oberholzer, 2012). O herpes zoster é uma manifestação clínica da reactivação do VZV e está associado a várias condições imunodepressoras, incluindo quimioterapia. Esta publicação descreve um caso raro de herpes zoster genital num paciente (com história de varicela aos 10 anos) submetido a quimio e radioterapia pós-cirúrgica para tratamento de uma neoplasia rectal. Pacientes imunodeprimidos apresentam então um maior risco de reactivação do VZV e desenvolvimento de herpes zoster que poderá ser fatal devido a uma disseminação descontrolada.

### **5.2.2. Infecções oportunistas em oncologia veterinária**

O recente crescimento da oncologia veterinária tem levado às mesmas preocupações de ordem médica, sobejamente conhecidas em medicina humana. Estas preocupações prendem-se novamente com a provável imunodepressão resultante das neoplasias e seus tratamentos e a possibilidade de desenvolvimento de infecções oportunistas.

Em 1998, foi reportado um caso de papilomatose cutânea num cão submetido a tratamento quimioterápico prolongado para linfoma. A totalidade do tratamento incluiu a administração de L-asparaginase, ciclofosfamida, vincristina, vimblastina, doxorubicina, metotrexato, actinomicina-D, mitoxantrona, mecloretamina, procarbazona, clorambucilo e corticosteróides. A imunodepressão tem sido sugerida como factor de risco para o desenvolvimento de papilomatose em cães e, neste caso, é justo fazer essa associação. Contudo, não foram realizados testes de função imunológica neste animal, pelo que apenas se pode especular sobre esta conclusão (Lucroy, Hill, Moore & Madewell, 1998). Os autores

citam ainda outro caso, ocorrido anos antes (Sundberge et al., 1994), em que se verificou o desenvolvimento de papilomatose oral e cutânea e demodicose num cão sujeito a terapêutica prolongada com corticosteróides. A interrupção da medicação, juntamente com a administração de antibióticos e amitraz, foi suficiente para curar o animal. Este caso sugere novamente que a imunodepressão induzida pelo uso prolongado de corticosteróides pode reactivar um papilomavírus latente e aumentar o tropismo tecidual do mesmo.

### **5.3. Recuperação do sistema imunitário após quimioterapia**

Embora os tratamentos antineoplásicos constituam situações morosas, são também situações temporárias. Como tal, é de esperar que a imunodepressão causada por neoplasias e seus tratamentos seja, também ela, transitória.

#### **5.3.1. Recuperação do sistema imunitário em oncologia humana**

Em 1992, foi realizado um estudo para avaliar a recuperação da resposta humoral em crianças submetidas a quimioterapia para LLA (Alanko, Pelhiemi & Salmi, 1992). No final do tratamento, os parâmetros avaliados (leucócitos e respectiva contagem diferencial, contagem de linfócitos B e Ig) encontravam-se abaixo dos valores de referência na maioria dos pacientes. A partir daí, verificou-se um restabelecimento dos mesmos parâmetros, sendo os linfócitos B os primeiros a recuperar (no primeiro mês pós-quimioterapia, 92% dos pacientes apresentavam valores normais). Contudo, os títulos de Ig, que reflectem a capacidade funcional dos linfócitos B, recuperaram mais lentamente (de 6 a 9 meses). Assim, os autores concluíram que, 6 meses após o final da quimioterapia, o sistema imunitário destes pacientes (no que se refere aos parâmetros analisados) se encontra suficientemente funcional para permitir a interrupção de possíveis antibioterapias e o recomeço de programas de vacinação. Este estudo foi realizado com o intuito de avaliar a recuperação do sistema imunitário, pelo que não foram realizadas medições antes do início da quimioterapia. Assim, não foi possível concluir acerca da influência da neoplasia/tratamento nos constituintes do sistema imunitário.

Mais tarde, Mackall verificou que a contagem de linfócitos recupera para valores normais cerca de 3 meses após o tratamento com fármacos antineoplásicos. Dos linfócitos analisados, as células NK foram as primeiras a recuperar (atingiram valores normais logo após a quimioterapia), seguidas dos linfócitos B que recuperaram entre 1 a 3 meses após o final da quimioterapia. Os linfócitos T CD8+ apenas recuperaram 3 a 6 meses após a quimioterapia, sendo os linfócitos T CD4+ os últimos a recuperar (cerca de 6 meses após a quimioterapia). Nesta publicação, o autor refere que, apesar de a depleção de linfócitos T CD4+ induzida pela quimioterapia ser independente da idade e relacionada com a intensidade do tratamento, a sua recuperação é altamente dependente da idade. Em pacientes mais velhos, há então uma depleção persistente dos linfócitos T CD4+.

provavelmente devido à diminuição gradual da massa tímica, enquanto os pacientes mais jovens recuperam mais rapidamente (Mackall, 1999).

Em 2001, Moritz e seus colaboradores avaliaram a recuperação dos linfócitos T em crianças com LLA, verificando que a maioria (78%) recuperou completamente os valores de linfócitos T e suas subclasses antes do tratamento de manutenção. Cerca de 44% dos pacientes recuperaram um rácio CD4+/CD8+ normal, pelo que os autores sugerem um grau semelhante de impacto sobre os linfócitos T auxiliares (CD4+) e os linfócitos T citotóxicos (CD8+). As células precursoras também apresentaram valores normais em 94% dos pacientes, indicando a manutenção de actividade tímica residual. Os parâmetros analisados voltaram a sofrer uma diminuição durante o tratamento de manutenção, o que sugere que as alterações imunitárias encontradas em crianças com LLA se devem ao tratamento citotóxico e não a uma incapacidade de regeneração consequente da doença em causa. Isto é, embora a LLA (e outras neoplasias hematopoiéticas) seja capaz de diminuir o número de linfócitos, o comprometimento prolongado do sistema imunitário não é da sua responsabilidade (Moritz, Eder, Meister & Heitger, 2001).

Mais recentemente, Kovacs et al. (2008) verificaram que, um ano após a finalização de tratamentos antineoplásicos, 53,5% de crianças com leucemia e 28,9% de crianças com tumores sólidos ainda apresentavam alterações dos parâmetros imunológicos. Os autores concluíram que a terapêutica citotóxica resulta em depressão prolongada do sistema imunitário (41% dos pacientes estudados ainda apresentavam alterações nas funções do sistema imunitário, um ano após o tratamento), sendo esta mais significativa em pacientes leucémicos, quando comparada com pacientes com tumores sólidos. Como seria de esperar, os pacientes leucémicos tiveram significativamente mais infecções durante o primeiro ano pós-tratamento do que os pacientes com tumores sólidos.

### **5.3.2. Recuperação do sistema imunitário em oncologia veterinária**

Também em medicina veterinária tem sido estudada a recuperação dos vários constituintes do sistema imunitário.

Em 2002, Winnicka e seus colaboradores realizaram um estudo com o intuito de avaliar as variações imunitárias em cães sujeitos a quimioterapia para linfoma multicêntrico. Para isso, foram avaliadas as percentagens das subclasses de linfócitos antes e durante o tratamento, que consistiu numa associação de ciclofosfamida, vincristina, citarabina e prednisolona. Antes do tratamento, o número de linfócitos T e as percentagens das suas subclasses (CD5+, CD4+ e CD8+) encontradas nos cães com linfoma eram significativamente inferiores às do grupo controlo, enquanto que as contagens de leucócitos e linfócitos B (CD21-*like*+) eram superiores no primeiro grupo. A quimioterapia resultou numa diminuição do número de leucócitos e linfócitos B e num aumento das subclasses de linfócitos T, regressando os valores para os intervalos observados em animais saudáveis. Cães com linfoma (antes da

quimioterapia) exibiram uma maior percentagem de linfócitos T CD4+ em relação à de linfócitos T CD8+ (rácio CD4+/CD8+ elevado). Em animais saudáveis e em animais sujeitos a quimioterapia, isto não se verifica. Desta forma, estes resultados diferem do que se tem verificado em medicina humana, onde parece existir uma maior alteração da imunidade celular do que da humoral durante o tratamento antineoplásico (Winnicka, Jagielski, Hoffmann-Jagielska & Lechowski, 2002).

Numa publicação de 2005, foram avaliados os linfócitos de animais saudáveis, de cães em remissão após tratamento para linfoma B e de cães em remissão após tratamento para linfoma T (Gauthier, Aubert, Abrahms-Ogg, Woods & Bienzle, 2005). Os autores tentaram estabelecer intervalos de referência para as várias subclasses de linfócitos em animais saudáveis e avaliar se a linfopénia causada pela quimioterapia é consequência da destruição dos linfócitos malignos circulantes, ou de uma diminuição específica de algumas destas subclasses. Comparativamente aos animais saudáveis, os animais com linfoma em remissão apresentaram contagens de linfócitos e hematócritos significativamente inferiores. Os parâmetros linfocitários revelaram-se semelhantes nos cães tratados, independentemente do fenótipo do linfoma. Contudo, verificou-se uma redução no número de linfócitos superior a 50%, assim como uma diminuição da maioria das suas subclasses (14 em 20), em relação aos animais saudáveis. Além disso, verificou-se um aumento dos linfócitos CD3+, CD90+ e TCRαβ, e uma diminuição dos linfócitos CD45RA+. A molécula CD45RA parece ser expressa em linfócitos imaturos, pelo que a sua diminuição em animais sujeitos a quimioterapia sugere uma inibição da regeneração de linfócitos B e/ou T. Assim, os autores concluíram que a quimioterapia é responsável por uma diminuição profunda na maioria das subclasses de linfócitos e por um compromisso da regeneração linfocitária, existindo um aumento relativo das células memória em relação às células imaturas. Contudo, não foi possível diferenciar a influência do linfoma da influência do seu tratamento, uma vez que os parâmetros não foram avaliados antes do início da terapêutica.

#### **5.4. Resposta vacinal em pacientes oncológicos**

Outra das preocupações existentes em pacientes oncológicos consiste na possível reactivação de doenças para as quais estes pacientes foram previamente vacinados. Além disso, é importante avaliar a resposta imunitária de pacientes submetidos a tratamentos antineoplásicos, de forma a desenhar protocolos de vacinação pós-quimioterapia adequados.

##### **5.4.1. Resposta vacinal em oncologia humana**

No início dos anos setenta, crianças com leucemia aguda foram vacinadas contra um vírus *Influenza*, durante o tratamento com um protocolo de associação de fármacos. As crianças apresentaram uma resposta imunitária diminuída (quando comparadas com um grupo

controlo), tendo contudo sido encontrada uma maior diminuição na resposta humoral primária do que na resposta humoral secundária (Borella & Webster, 1971).

Após a realização de vários estudos sobre o tema, foi sugerido que a reimunização em pacientes oncológicos só deve ser realizada 6 a 12 meses após o final da quimioterapia, devendo dar-se preferência a vacinas mortas. Vacinas vivas atenuadas, por outro lado, só devem ser administradas 24 meses após a conclusão da quimioterapia (Mackall, 1999).

Em 2002, Nilsson e seus colaboradores avaliaram a resposta humoral à revacinação para Ag virais (sarampo e rubéola), em crianças tratadas para LLA. Após o tratamento, apenas 60% e 72% das crianças mantiveram títulos de Ac protectores contra o sarampo e a rubéola, respectivamente, tendo por isso existido uma diminuição do número de Ac durante a quimioterapia. O número de plasmócitos existentes na medula óssea também sofreu uma diminuição durante o tratamento mas regressou a valores normais 6 meses depois. A revacinação das crianças que não conservaram um título de Ac protector contra as referidas doenças foi capaz de induzir uma resposta imunitária primária e secundária, mas 43% e 21% dos pacientes não atingiram títulos protectores contra o sarampo e a rubéola, respectivamente. Assim, os autores concluíram que uma grande percentagem de crianças perde protecção contra estes agentes vacinais durante a quimioterapia (principalmente as mais novas), sendo por isso aconselhável a sua revacinação após o final do tratamento. Contudo, os autores consideraram necessária a realização de mais estudos, de forma a definir o momento correcto da referida vacinação.

Em 2003, Reinhardt e seus colaboradores concluíram que a quimioterapia em crianças causa alterações imunitárias, incluindo comprometimento da imunidade humoral a longo prazo. Durante a quimioterapia, verificou-se uma diminuição significativa dos títulos de Ac, atingindo-se valores abaixo do nível protector em 6% das crianças para o sarampo e a papeira; em 45% para a poliomielite; e em 21% para a difteria. Contrariamente, os Ac contra a rubéola e o tétano (que também diminuíram) mantiveram-se acima do título protector em 100% dos casos. Após o tratamento, a percentagem de crianças com diminuição significativa do título de Ac contra o sarampo, a papeira, a difteria e o tétano aumentou. A revacinação 3 a 5 meses após a quimioterapia produziu títulos de Ac semelhantes aos verificados antes da quimioterapia, sendo que apenas 7% das crianças com títulos anteriormente protectores não responderam à vacina. Das crianças seronegativas no momento do diagnóstico e aquelas cujos títulos de Ac diminuíram abaixo do nível protector durante a quimioterapia, 38% não responderam à vacinação. Uma vez que o título de Ac foi recuperado na maioria das crianças após revacinação, os autores aconselham que esta seja realizada, principalmente em pacientes seronegativos ou com drástica diminuição do título de Ac durante o tratamento.

Um estudo semelhante investigou a persistência de títulos de Ac protectores em crianças submetidas a quimioterapia, 15 meses (em média) após a sua finalização. A ausência de Ac

protectores para hepatite B, sarampo, papeira, rubéola, tétano e poliomielite foi detectada em 46%, 25%, 26%, 24%, 14% e 7% dos pacientes, respectivamente, tendo a diminuição dos títulos de Ac contra a rubéola, a papeira e o sarampo sido associada a uma idade mais baixa. A revacinação de pacientes com diminuição do título de Ac  $\geq 1$  resultou numa taxa de resposta de 93%, sugerindo que a incapacidade de montar uma resposta humoral é temporária (regressando ao normal um ano após o final da quimioterapia). Também estes autores concluíram que a quimioterapia em pacientes pediátricos provoca uma diminuição do título de Ac protectores adquiridos em vacinações prévias e que a revacinação um ano após o final da quimioterapia é uma maneira prática e eficaz de restaurar a imunidade humoral contra a maioria destas doenças (Zignol et al., 2004).

Em 2004, foi realizado outro estudo que pretendia examinar os efeitos do tratamento intensivo para LLA em crianças e comparar a resposta vacinal contra o tétano, a difteria e o *Haemophilus influenzae b* (Hib), um e seis meses após o final da terapêutica. Tal como em outros trabalhos, os títulos de Ac para as três doenças diminuíram durante o tratamento, tendo esta diminuição sido mais evidente em pacientes de alto risco (sujeitos a quimioterapia mais intensiva), uma vez que nenhum deles apresentou protecção completa contra a difteria e o tétano no final do tratamento. Após revacinação, apenas nos pacientes de alto risco se verificou uma diminuição da resposta. Os pacientes dos grupos de risco normal e intermédio e de um grupo controlo, exibiram uma grande quantidade de IgG plasmática, uma semana após a revacinação, enquanto que no grupo de alto risco se verificou uma maior produção de IgM. Isto sugere o desenvolvimento de uma resposta primária e, portanto, um compromisso da memória imunitária nestes pacientes. Para finalizar, não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os resultados da revacinação, um ou seis meses após o tratamento, em nenhuma das doenças. Assim, os autores concluíram que o compromisso da resposta imunitária está dependente do grupo de risco onde se insere o paciente e, por consequência, da intensidade do tratamento a que é submetido. Este compromisso parece estar relacionado com o número de linfócitos B de memória, já que são estas as células que necessitam ser reactivadas para que haja produção de Ac. Além disso, os autores também aconselham a revacinação após o final da quimioterapia, embora sugeriram que o número de doses e o calendário devam ser adaptados à intensidade do tratamento (Torben, Mellander, Hahn-Zoric & Abrahamsson, 2004).

#### **5.4.2. Resposta vacinal em oncologia veterinária**

Em 2001 foi realizado um estudo por Henry e colaboradores no qual se avaliou a presença de Ac para algumas das mais importantes doenças caninas prevenidas por vacinação (esgana [*Canine Distemper virus* - CDV], parvovirose [*Canine Parvovirus* - CPV] e raiva [*Canine Rabies virus* - CRV]) em cães submetidos a tratamento quimioterápico. Os 37 animais estudados foram divididos em dois estudos diferentes. No estudo A, o título de Ac

para o CDV e o CPV foi determinado antes do início da quimioterapia e durante o decurso da mesma, sendo os títulos iniciais comparados com os de animais saudáveis. Neste estudo, foram incluídos animais com neoplasias variadas, incluindo linfoma. O título de Ac para o CPV não sofreu alteração em 52% dos animais, tendo aumentado em 33% dos canídeos e diminuído em 14% dos casos. Relativamente ao CDV, o título de Ac não se alterou em 81% dos cães, tendo diminuído em 14% dos animais. Contudo, nenhuma das alterações encontradas foi significativa. No estudo B, que apenas incluiu animais com linfoma, foram analisados os títulos de IgG plasmáticas para os três vírus, antes do início da quimioterapia e em vários momentos da mesma. Antes do tratamento, apenas 62,5% dos animais apresentavam títulos de Ac protectores para o CDV; no entanto, no final da quimioterapia, esta percentagem aumentou para 69%. Relativamente ao CPV, 56% dos animais apresentaram títulos de Ac protectores antes de iniciarem o protocolo, tendo esta percentagem diminuído para 37,5% no final da terapêutica. Finalmente, antes do início do tratamento, 81% dos animais apresentaram títulos de Ac protectores para o CRV e, após a sua finalização, esta percentagem manteve-se semelhante. Contudo, nenhuma das alterações verificadas foi significativa. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a imunidade adquirida em vacinações prévias para estas doenças (ou por exposição natural), não parece ser significativamente comprometida pelos tratamentos quimioterápicos utilizados nestes animais. De facto, no estudo A, os títulos de Ac para o CPV aumentaram em 7 animais, sugerindo que a capacidade de responder a uma exposição natural devida a visitas repetidas ao hospital se mantém inalterada. O facto de nenhum dos animais ter sofrido um aumento do título de Ac para o CDV, sugere que a possibilidade de exposição em ambiente hospitalar é inferior à do CPV. Assim, apesar de se saber que a quimioterapia induz neutropénia, afectando a fagocitose, estes resultados sugerem que é mantida uma imunidade humoral suficiente, permitindo a protecção contra uma eventual exposição natural. Além disso, este estudo sugere ainda que a neoplasia *per se* não tem influência significativa na imunidade humoral contra os vírus estudados, já que não foram encontradas diferenças significativas entre os títulos de Ac iniciais do grupo A e dos animais controlo (Henry et al., 2001).

Mais tarde, Walter e colaboradores (2006) realizaram um estudo que pretendia avaliar os efeitos de dois protocolos quimioterápicos no número de linfócitos B e T e na resposta humoral a revacinações em cães com neoplasias. Os animais foram divididos em 2 grupos: (1) um constituído por 12 animais sujeitos a um protocolo com doxorrubicina (9 osteossarcomas e 3 linfomas); (2) e outro constituído por animais com linfoma sujeitos a um protocolo de associação de fármacos (CHOP + L-asparaginase).

Antes do tratamento, os animais em estudo apresentavam significativamente menos linfócitos e subclasses de linfócitos T CD4+ e CD8+ do que o grupo controlo. Estes parâmetros não apresentaram uma diferença significativa ao comparar animais com linfoma

e animais com osteossarcoma. A contagem de linfócitos B não foi significativamente diferente entre os cães com neoplasias e os cães saudáveis, contudo, os cães com osteossarcoma apresentaram significativamente menos linfócitos B que os cães com linfoma.

A doxorubicina isolada não diminuiu significativamente nenhum dos parâmetros avaliados. O CHOP não alterou significativamente os linfócitos T CD4+, embora tenha causado uma diminuição significativa nos linfócitos T CD8+, uma semana após o início do tratamento. Estes linfócitos recuperaram para valores normais, não tendo sido significativamente diferentes em nenhum outro momento do protocolo. No entanto, o CHOP causou uma diminuição significativa e persistente (de pelo menos 6 meses) dos linfócitos B.

Os títulos de Ac após revacinação não diferiram significativamente dos encontrados em animais saudáveis, tendo sido superiores no grupo tratado com CHOP.

Ao contrário do que se pensava, e embora o CHOP tenha induzido uma diminuição prolongada dos linfócitos B, os resultados obtidos indicam que os protocolos estudados não exercem um grande impacto no número de linfócitos T, ou na capacidade de montar uma resposta humoral. Assim, os autores sugerem que a diminuição linfocitária em cães com linfoma se deve principalmente aos efeitos da neoplasia e não tanto à quimioterapia. De facto, animais com linfoma e osteossarcoma exibiram níveis de linfócitos T inferiores aos do grupo controlo, antes do início do tratamento. Apesar de não se ter verificado uma diminuição significativa dos linfócitos T CD4+ e CD8+ no grupo de cães tratados, a capacidade funcional destas células não foi investigada directamente. No entanto, a função dos linfócitos T CD4+ não parece ter sido afectada, uma vez que os animais tratados foram capazes de montar uma resposta humoral semelhante à dos animais saudáveis. O mesmo parece acontecer com os linfócitos T CD8+, dada a pequena incidência de infecções oportunistas reportada nestes animais. Apesar da diminuição dos linfócitos B em cães tratados com CHOP, esta não foi suficiente para impedir uma resposta humoral adequada, o que sugere que os linfócitos B de memória e os plasmócitos são mais resistentes aos efeitos dos protocolos de associação (Walter, Biller, Lana, Bachand & Dow, 2006).

### **5.5. Considerações finais: oncologia humana vs oncologia veterinária**

Como se pode perceber após análise cuidada, são bastantes as publicações existentes em medicina humana sobre o impacto de fármacos citotóxicos no sistema imunitário. Contudo, o seu delineamento experimental é, muitas vezes, complexo e as conclusões por vezes contraditórias (Tilburg, Sanders, Rovers, Wolfs & Bierings, 2006). Além disso, a maioria dos trabalhos são realizados num grupo de pacientes com diferentes neoplasias, sujeitos a diferentes protocolos, não existindo muita informação sobre neoplasias e protocolos específicos (com excepção da grande quantidade de estudos sobre LLA em crianças).

De uma maneira geral, os resultados obtidos ao longo dos anos comprovam uma diminuição numérica e funcional dos vários constituintes do sistema imunitário, existindo geralmente uma maior alteração (em quantidade e duração) da imunidade celular do que da humoral (Rasmussen & Arvin, 1982; Komada et al., 1992; Mackall et al., 1994; Mackall, 1999).

No que se refere à imunidade celular, alguns autores afirmam verificar-se uma diminuição no número de linfócitos T, sendo os CD4+ mais afectados que os CD8+ (Mackall et al., 1994; Mackall, 1999), o que resulta numa diminuição do rácio CD4+/CD8+ (Komada et al., 1992). Pelo contrário, outros defendem que a quimioterapia afecta de igual modo os linfócitos T CD4+ e CD8+ (Moritz et al., 2001). Os linfócitos T de memória são tipicamente mais resistentes que os linfócitos T imaturos, pelo que se pensa serem responsáveis pela manutenção de uma imunidade protectora em alguns casos (Haining et al., 2005). As células NK parecem ser o constituinte mais resistente da imunidade celular, sendo as primeiras a recuperar após o final do tratamento (Komada et al., 1992; Mackall et al., 1994; Mackall, 1999), o que sugere que se possam tratar de uma segunda linha de defesa contra infecções oportunistas.

Relativamente à imunidade humoral, a resposta primária parece ser mais afectada que a secundária (Borella & Webster, 1971), o que está de acordo com a evidência de que as células memória são mais resistentes que as células imaturas. Contudo, parte da memória imunológica é perdida (como sugerido por uma resposta subóptima de alguns pacientes a revacinações pós-quimioterapia) (Borella & Webster, 1971; Reinhardt, Houliara, Pekrun, Lakomek & Krone, 2003; Torben et al., 2004; Zignol et al., 2004). Embora se verifique uma diminuição dos constituintes da imunidade humoral, esta é temporária recuperando após o final do tratamento. Os linfócitos B são os primeiros a regressar a valores normais (1-3 meses), seguidos das Ig (6-9 meses), sendo por isso também sugerida uma alteração funcional dos linfócitos B (Alanko et al., 1992; Komada et al., 1992; Mackall et al., 1994; Mackall, 1999). Assim, embora os pacientes sujeitos a quimioterapia percam, em maior ou menor grau, a protecção contra doenças que podem ser prevenidas através de vacinação, a resposta à revacinação não é afectada na maioria dos casos (Nilsson et al., 2002; Reinhardt et al., 2003; Torben et al., 2004; Zignol et al., 2004). De facto, a maioria dos autores aconselha a revacinação destes pacientes 6 meses a 1 ano após o final da quimioterapia (Alanko et al., 1992; Mackall, 1999; Reinhardt et al., 2003; Zignol et al., 2004) para reposição dos títulos de Ac, aconselhando ainda que as doses e o calendário adequado devem ser adaptados ao grupo de risco no qual se inclui o paciente e à intensidade da terapêutica administrada (Torben et al., 2004).

Finalmente, as plaquetas e leucócitos (neutrófilos, monócitos) sofrem uma diminuição fugaz, recuperando parcialmente entre cada ciclo quimioterápico (Mackall et al., 1994). Contudo, não só uma contagem de neutrófilos < 500/ $\mu$ L parece predispor para a reactivação de casos

de MRSA (Crysandt et al., 2010), como uma linfopénia absoluta  $< 500/\mu\text{L}$  aumenta o risco de disseminação do VZV (Feldman et al., 1975).

Embora a quimioterapia seja a principal responsável por estas alterações, algumas neoplasias são também capazes de provocar algum grau de imunodepressão, principalmente as hematopoiéticas (leucemia, linfoma) (Rasmussen & Arvin, 1982; Haining et al., 2005; Kovacs et al., 2008). No entanto, a neoplasia *per se* não parece influenciar a capacidade de regeneração do sistema imunitário, sendo o tratamento antineoplásico o principal responsável pela manutenção da imunodepressão (Moritz et al., 2001).

Contrariamente ao que se verifica em medicina humana, o conhecimento existente em medicina veterinária sobre a imunodepressão em pacientes oncológicos permanece escasso e controverso. De facto, existem autores que acreditam no papel da neoplasia *per se* na imunodepressão verificada nestes pacientes, sendo que diferentes neoplasias exercem diferentes influências no sistema imunitário (Weiden et al., 1974; Winnicka et al., 2002; Walter et al., 2006). Outros defendem que a influência da neoplasia não é significativa, sendo mantida uma capacidade de resposta humoral suficiente para proteger os animais contra exposições naturais ou vacinações (Henry et al., 2001). Por outro lado, o fenótipo do linfoma não parece influenciar os parâmetros imunitários (Gauthier et al., 2005).

Ao contrário do que se pensava pelo conhecimento retirado de medicina humana, a quimioterapia também não parece ter um impacto muito significativo no número de linfócitos T e na resposta humoral (Walter et al., 2006; Lima, 2011). Além disso, se em medicina humana o efeito das terapêuticas imunodepressoras parece ser maior na imunidade celular, os estudos realizados em cães sugerem que a imunidade humoral é a mais afectada (Winnicka et al., 2002; Walter et al., 2006). No entanto, este facto não se traduz num compromisso significativo da resposta humoral a vacinações subsequentes. Embora os animais sujeitos a tratamentos antineoplásicos não pareçam perder a capacidade de montar uma resposta humoral contra a maioria das doenças prevenidas por vacinação (Henry et al., 2001; Walter et al., 2006; Lima, 2011), existem casos reportados de reactivação e desenvolvimento de algumas infecções oportunistas como a papilomatose e a demodicose (Sundberge et al., 1994; Lucroy et al., 1998). Por outro lado, após o tratamento parece ocorrer uma diminuição das subclasses de linfócitos e dos linfócitos imaturos, o que sugere uma inibição da capacidade de regeneração dos linfócitos B e/ou T (Gauthier et al., 2005). A administração de fármacos como os glucocorticóides em doses imunodepressoras diminui a expressão dos marcadores fenotípicos dos linfócitos e induz a sua apoptose (Ammersbach et al., 2006). No entanto, nem todos os fármacos exercem o mesmo efeito sobre os parâmetros imunitários (Walter et al., 2006).

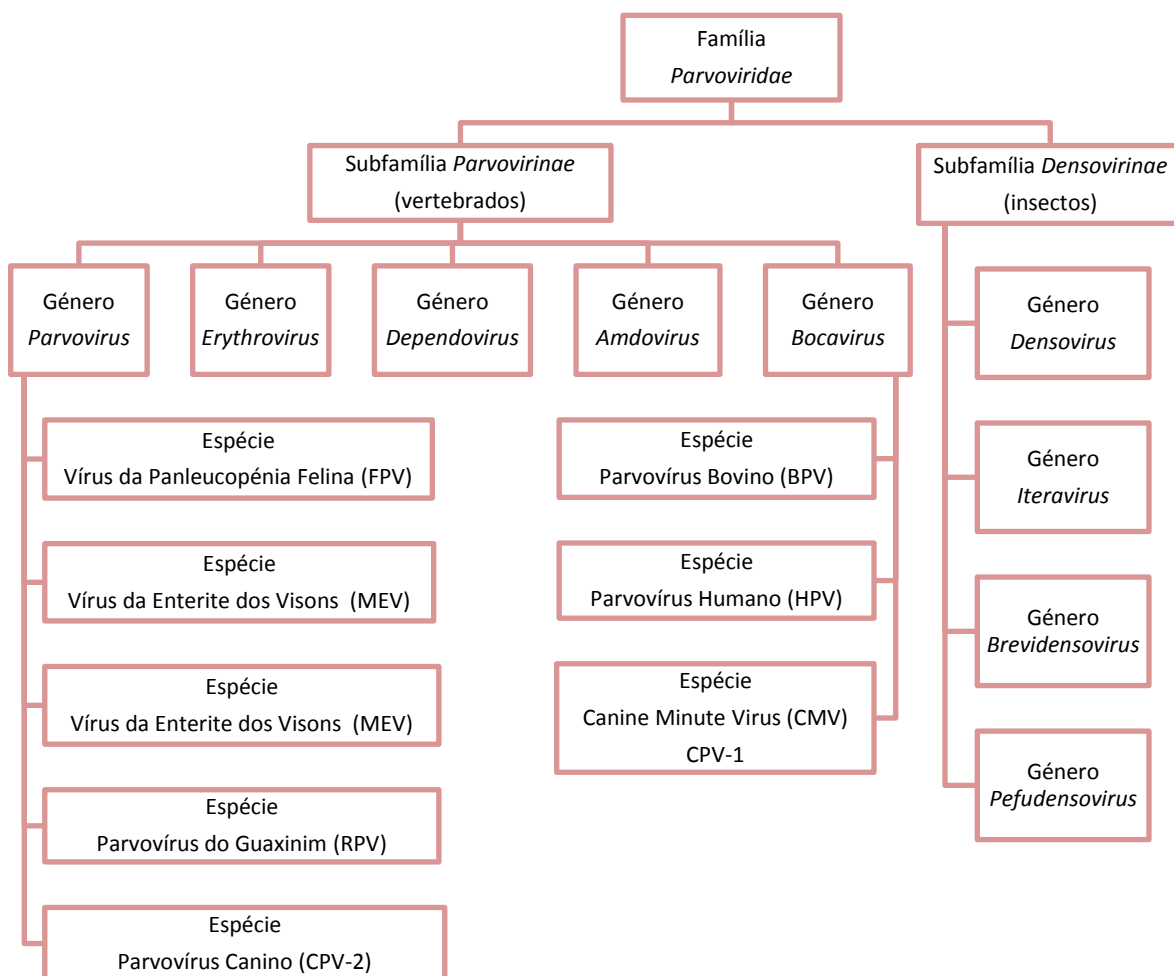
## 6. Parvovirus canino

Várias são as características que tornam o parvovirus canino (CPV) um modelo viral adequado para o presente estudo. A parvovirose canina é uma doença passível de ser prevenida através de vacinação, sendo que o CPV apresenta uma elevada prevalência em Portugal. Além disso, este vírus é capaz de induzir infecções assintomáticas e é de fácil detecção/monitorização.

### 6.1. Taxonomia e estrutura molecular

O CPV pertence ao género *Parvovirus*, subfamília *Parvovirinae* e família *Parvoviridae* (Berns & Parrish, 2007) (Figura 2). Os parvovirus são pequenos vírus (cerca de 25nm de diâmetro) sem invólucro que infectam vertebrados. Têm uma cápside esférica, composta por três proteínas estruturais (VP1, VP2 e VP3), que envolve uma molécula simples de ADN linear, constituída por cerca de 5000 nucleótidos. A VP2 é a proteína estrutural mais importante (constitui cerca de 90% da cápside viral) e é a principal responsável pela variabilidade de espécies que o vírus é capaz de infectar (Decaro & Buonavoglia, 2012).

**Figura 2:** Taxonomia do parvovirus canino (adaptado de Decaro & Buonavoglia, 2012)



## 6.2. Evolução do parvovírus canino

Pensa-se que o CPV terá surgido a partir do vírus da panleucopénia felina (*Feline panleukopenia virus* - FPV) ou de um parvovírus de carnívoros selvagens, através de uma série de mutações genéticas. Este novo vírus foi denominado parvovírus canino do tipo 2 (CPV-2), para se distinguir do *minute virus of canines* (MVC), anteriormente conhecido como parvovírus canino do tipo 1 (CPV-1) (Truyen, 2006). De facto, o CPV-1, isolado pela primeira vez em 1970 (Binn, Lazar, Eddy & Kajima, 1970), não possui relação genética ou antigénica com o CPV-2.

O CPV-2 foi identificado em 1978 e foi responsável pela ocorrência de epizootias graves e frequentemente fatais de gastroenterites hemorrágicas e miocardites subagudas por todo o mundo (Truyen, 2006). O padrão evolutivo do CPV-2 tem sido consideravelmente mais rápido do que o FPV, chegando a ter taxas de substituição genómica semelhantes aos vírus de ARN ( $10^{-4}$  substituições por locus, por ano) (Shackelton, Parrish, Truyen & Holmes, 2005). De facto, pouco tempo depois da sua identificação, surgiram duas novas estirpes, designadas de CPV do tipo 2a (CPV-2a) em 1979, e do tipo 2b (CPV-2b) em 1984 (Parrish et al., 1988). Actualmente, estas duas variantes substituíram por completo a estirpe original (CPV-2) que é, no entanto, utilizada na maioria das vacinas existentes no mercado (Truyen, 2006). Em 2000, foi detectada uma nova variante em Itália, a que se deu o nome de CPV do tipo 2c (CPV-2c) (Buonavoglia et al., 2001). Esta nova estirpe, que difere do CPV-2b em dois aminoácidos (Tabela 3), tem agora uma distribuição mundial, incluindo Portugal (Vieira et al., 2008).

Esta evolução permitiu ao vírus adaptar-se a novos hospedeiros e as novas variantes, os CPV-2a e CPV-2b, readquiriram a capacidade de infectar felídeos (Truyen, 2006). O CPV-2c mantém essa capacidade (Battilani et al., 2006; Decaro et al., 2010, 2011). Além disso, as novas estirpes são gradualmente mais patogénicas (Decaro et al., 2005c; Berns & Parrish, 2007). O CPV-2c é portanto considerado mais virulento que as estirpes anteriores (Goddard & Leisewitz, 2010) embora também já tenha sido associado a sintomatologia mais ligeira (Decaro et al., 2005b).

A contínua evolução do CPV através da acumulação de mutações pontuais no genoma viral tem duas grandes implicações. Por um lado, o desenvolvimento de novas variantes, com propriedades antigénicas e biológicas diferentes, pode requerer uma revisão cuidada dos programas vacinais e estirpes utilizadas. Por outro lado, pode igualmente ser necessária a actualização das técnicas moleculares capazes de caracterizar as várias estirpes (Decaro & Buonavoglia, 2012).

**Tabela 3:** Variação dos aminoácidos na proteína VP2 dos diferentes CPV's (adaptado de Decaro & Buonavoglia, 2012)

Posição Codão	3045-47	3087-89	3675-77	3684-86	3699-701	3909-11	4062-64	4449-51
<b>CPV-2</b>	Met (ATG)	Ile (ATT)	Ser (TCT)	Ala (GCT)	Asp (GAT)	Asp (GAT)	Asn (AAT)	Val (GTA)
<b>CPV-2a</b>	Leu (TTG)	Tir (ACT)	Ser (TCT)	Gli (GGT)	Tir (TAT)	Asp (GAT)	Asn (AAT)	Ile (ATA)
<b>CPV-2b</b>	Leu (TTG)	Tir (ACT)	Ser (TCT)	Gli (GGT)	Tir (TAT)	Asp (GAT)	Asp (GAT)	Val (GTA)
<b>CPV-2c</b>	Leu (TTG)	Tir (ACT)	Ala (GCT)	Gli (GGT)	Tir (TAT)	Asp (GAT)	Glu (GAA)	Val (GTA)

### 6.3. Incidência e patogenia

O CPV pode infectar animais de todas as idades, mas infecções graves são mais comuns em cachorros de 4-12 semanas de idade, quando se verifica diminuição dos anticorpos de origem materna (AOM) (Greene & Decaro, 2012). Os adultos são geralmente resistentes à infecção devido à existência de imunidade específica, induzida através de vacinação ou contacto prévio com o vírus. Assim, a taxa de mortalidade pode ir até aos 70% em cachorros, não chegando normalmente a 1% em adultos (Decaro & Buonavoglia, 2012). Apesar da maior susceptibilidade dos animais mais jovens, recentemente tem-se vindo a verificar a ocorrência de parvovirose em cães adultos, e por vezes vacinados, quase sempre associada ao CPV-2c (Decaro et al., 2008). Todas as raças são susceptíveis, mas parece haver uma maior predisposição no Rottweiler, Dobermann Pincher, English Springer Spaniel, Pastor Alemão e Labrador Retriever (Houston, Ribble & Head, 1996). A doença pode ser mais grave em animais que possuam já uma barreira intestinal comprometida, como se observa em infecções por coronavírus ou endoparasitismo (Carr-Smith, Macintire & Swango, 1997).

A infecção dá-se pela via oronasal, à qual se segue uma intensa replicação no tecido linfóide, incluindo linfonodos, amígdalas, orofaringe e placas de Peyer. Três a quatro dias após a infecção, verifica-se uma disseminação para a corrente sanguínea (virémia) e, durante os 3-4 dias seguintes, os vírus atingem os órgãos alvo onde se dá a replicação viral no núcleo celular (Stann, DiGiacomo, Giddens & Evermann, 1984; Meunier, Cooper, Appel, Lanieu & Slauson, 1985a). Como este vírus necessita de células em divisão rápida para se replicar, os órgãos-alvo mais comuns são o miocárdio em fetos e recém-nascidos, e os tecidos hematopoiético e intestinal em jovens e adultos (Decaro & Buonavoglia, 2012). Na sua passagem pelo tecido linfóide (incluindo medula óssea), o CPV infecta leucócitos, induzindo linfopénia e, por vezes, neutropénia. Na sua passagem pelo intestino, o vírus afecta as células germinais das criptas de Lieberkühn, provocando enterite, destruição das vilosidades e diarreia hemorrágica (Pollock, 1982). Consequentemente à destruição da barreira intestinal pode também ocorrer septicémia (Nadi & Kumar, 2010).

Pelo facto de o CPV necessitar de células em divisão rápida para se replicar, existe uma maior susceptibilidade de infecção em animais mais jovens (Berns & Parrish, 2007). Como já foi referido, em animais de duas ou três semanas, o CPV é então capaz de se replicar nas

células cardíacas, induzindo uma miocardite fatal. No entanto, esta forma da doença está a tornar-se cada vez mais rara, visto que quase todos os animais desta idade estão protegidos pelos AOM (Greene & Decaro, 2012).

Assim, a forma clínica mais característica da infecção por CPV é a enterite hemorrágica. A sua gravidade depende, entre outros factores, dos títulos de AOM no momento da infecção. Os sinais clínicos têm início 3-7 dias após a infecção (Decaro et al., 2005c), sendo que os mais precoces incluem prostração, anorexia, vômito e diarreia mucóide ou sanguinolenta. A leucopénia é um sinal constante, por vezes atingindo valores de 2000-3000 células/ $\mu$ L. A excreção viral nas fezes é de curta duração: inicia-se 4 dias após a infecção, atinge um pico aos 4-7 dias, e termina por volta do 12<sup>o</sup> dia após a infecção (Meunier et al., 1985a).

Quando um animal sobrevive aos 4 primeiros dias, há uma grande probabilidade de recuperação rápida e aquisição de excelente imunidade, por vezes para a vida (Berns & Parrish, 2007). De facto, a partir do sexto dia pós-infecção, verifica-se uma diminuição dos títulos virais encontrados em todos os tecidos, associada à ausência de virémia e à presença de anticorpos circulantes (Meunier et al., 1985a; Meunier, Cooper, Appel, Slauson, 1985b). Tipicamente, a virémia persiste até que sejam atingidos títulos de Ac  $\geq$  1:40. A gravidade das lesões intestinais e dos sinais clínicos pode também estar altamente correlacionada com a duração e magnitude da fase de virémia. Esta virémia é composta por duas fases; uma fase plasmática e uma fase celular. A fase plasmática parece ser mais importante e resulta da destruição de linfócitos mediada pelo vírus.

Nem todos os animais infectados exibem sinais clínicos da doença. De facto, infecções subclínicas e assintomáticas são muitas vezes detectadas em cachorros em fase de diminuição dos AOM e em animais adultos (Decaro et al., 2005c; Berns & Parrish, 2007). No entanto, apesar da ausência de sinais clínicos, pode haver excreção do vírus nas fezes durante a fase aguda da enterite e verificar-se um aumento significativo dos Ac plasmáticos (seroconversão) (Stann, et al., 1984).

Nos animais que sucumbem à doença, as principais lesões observadas são enterite hemorrágica do intestino delgado com necrose das vilosidades intestinais, aumento dos linfonodos mesentéricos e das placas de Peyer (Greene & Decaro, 2012).

#### **6.4. Diagnóstico**

Um diagnóstico precoce da infecção por CPV é muito importante, quer para uma maior probabilidade de sucesso do tratamento, quer para prevenir o contágio de outros animais. O diagnóstico baseado na observação clínica é possível mas pouco rigoroso. De facto, muitos outros agentes têm a capacidade de causar diarreia nos cães como, por exemplo, o coronavírus, adenovírus, rotavírus, entre outros. Assim, uma suspeita clínica deve ser sempre acompanhada de testes laboratoriais, que utilizam materiais biológicos como fezes, na fase de excreção e sangue total ou plasma na fase de virémia.

O teste mais frequentemente utilizado em clínica baseia-se numa prova de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), para detecção de Ag viral. É um método qualitativo, específico e muito rápido, mas com menor sensibilidade que as provas moleculares. Esta baixa sensibilidade está associada à pequena quantidade de vírus excretados nas fezes durante a fase final da infecção ou à presença de títulos elevados de Ac neutralizantes no lúmen intestinal que sequestram a maior parte das partículas virais, na fase inicial da infecção (Desario et al., 2005). Por outro lado, também podem ocorrer falsos positivos 3-10 dias após a vacinação com vírus atenuados.

Para a detecção de Ac plasmáticos contra o CPV é frequente a realização de provas de ELISA indirecta ou de inibição da hemaglutinação (IH). Esta última prova baseia-se na capacidade que o CPV tem de aglutinar eritrócitos de suíno, pelo que a IH destas células indica a presença de Ac plasmáticos específicos anti-CPV.

No entanto, uma serologia positiva não é suficiente para o diagnóstico de CPV, já que os animais podem ser seropositivos devido a uma infecção anterior, muitas vezes subclínica, ou devido à própria vacinação. Assim, o diagnóstico serológico deve basear-se na detecção de Ac anti-CPV de origem recente (IgM's) (Prittie, 2004).

As técnicas moleculares têm a vantagem de não serem afectadas pelo sistema imunitário do hospedeiro, embora necessitem de técnicos experientes e equipamento sofisticado. Ao longo dos anos, foram sendo desenvolvidas várias provas baseadas em PCR, com elevada sensibilidade e especificidade, mas com a desvantagem de serem métodos qualitativos. Já o *qPCR* (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) (ou *real time PCR*) é uma prova com maior sensibilidade e especificidade que o PCR convencional, que permite a detecção e quantificação paralelas do ADN viral (Decaro et al., 2005a).

Embora não tenha influência do ponto de vista clínico, a caracterização do vírus encontrado pode ser importante a nível epidemiológico. Até à data não existe um método que permita diferenciar todas as variantes de CPV, sendo por vezes necessária a realização de mais do que uma prova para uma identificação correcta (Decaro et al., 2006a; Desario et al., 2005).

Contudo, é possível a diferenciação entre o CPV-2 (estirpe vacinal) e as estirpes selvagens (Pereira et al., 2000), o que é importante dada a dificuldade de diagnóstico correcto em amostras fecais de animais com diarreia, poucos dias após a vacinação. Isto acontece porque a estirpe vacinal, atenuada, é igualmente capaz de se replicar na mucosa intestinal e ser excretada nas fezes, embora por um período de tempo mais curto e em menor quantidade que a estirpe selvagem encontrada numa infecção natural (Decaro et al., 2006b; Greene & Decaro, 2012). A subtipificação do CPV é também importante para descartar a recuperação de virulência da estirpe vacinal (Decaro & Buonavoglia, 2012).

## 6.5. Profilaxia e vacinação

Os parvovírus são altamente contagiosos e estáveis no ambiente, dada a sua elevada resistência a variações de pH e temperatura e ao tratamento com a maioria dos desinfectantes (excepto, p.e. o hipoclorito de sódio) (Decaro & Buonavoglia, 2012). A infecção dá-se através do contacto oral com fezes ou superfícies contaminadas, podendo os viriões manter-se viáveis por mais de cinco meses, se as condições forem favoráveis (Jacob, Weiser, Hall & Kowalski, 1980). Assim, a incidência de infecção por parvovírus é maior em locais de alta densidade animal e condições de higiene deficientes.

A imunidade contra o CPV inicia-se com a passagem de AOM para os cachorros. A aquisição desta imunidade materna é muito importante. Caso ocorra uma falha neste processo de transferência, o animal corre um grande risco de infecção e morte. Contudo, a presença de concentrações elevadas de AOM inibe o desenvolvimento de uma resposta imunitária endógena. Assim, embora a diminuição progressiva dos AOM torne o animal mais susceptível à infecção, esta é necessária para o início da resposta imunitária individual, quer como consequência de uma infecção natural, quer como consequência de uma vacinação. Neste contexto, sabe-se que na ausência de transferência de AOM, os cachorros são capazes de montar uma resposta à vacina da parvovirose às duas semanas de idade (Toman et al., 2002).

Os AOM são adquiridos durante os primeiros 2-3 dias de vida, através do colostro e leite maternos. Depois, estes anticorpos sofrem uma diminuição com um tempo de semi-vida de cerca de 9-10 dias (Greene & Decaro, 2012). Este declínio leva ao aumento da susceptibilidade dos animais à infecção, determinando a necessidade de iniciar um protocolo vacinal (imunização activa) (Day, 2007). De facto, a vacinação é a principal medida profilática contra o CPV.

A maioria das vacinas utilizadas hoje em dia para o CPV são vacinas vivas atenuadas. Após a administração destas vacinas, pode ocorrer uma linfopénia transitória de 4-6 dias, sendo que a maior parte das estirpes vacinais é capaz de se replicar no intestino e ser excretada nas fezes. No entanto, elas já provaram ser seguras em inúmeros estudos. As alterações que ocorrem após a administração de uma vacina viva atenuada são muito semelhantes às que se verificam após a infecção pelo vírus selvagem. Dois dias após a vacinação ocorre virémia e, entre os dias 3 e 10, distribuição sistémica e excreção nas fezes. A resposta humoral é também semelhante nos dois casos. Os Ac plasmáticos são detectáveis 3 dias após a vacinação e os seus níveis aumentam rapidamente até serem atingidos os títulos verificados numa infecção natural. Mesmo que não ocorra nova exposição ao vírus, os títulos de Ac protectores podem manter-se até dois anos, sendo que cães expostos ao vírus durante esse intervalo de tempo não deverão ficar infectados. A principal diferença entre a dinâmica verificada com a vacinação e a dinâmica de uma infecção natural prende-se com a quantidade de vírus eliminada, como já foi referido (Greene & Decaro, 2012).

Um animal que sobreviva à infecção por CPV ficará imune, possivelmente para toda a vida. Deste modo, a necessidade de reforços anuais está a ser repensada, já que inúmeros estudos referem uma imunidade mais prolongada após vacinação (Twark & Dodds, 2000). A *World Small Animal Veterinary Association* (WSAVA) recomenda então uma vacinação inicial às 8-9 semanas de idade, seguida de um reforço após 3-4 semanas e uma terceira dose às 14-16 semanas. Depois, deverá fazer-se uma revacinação anual e, finalmente, uma revacinação de 3 em 3 anos (WSAVA, 2010).

Existe uma forte correlação entre o título de Ac neutralizantes encontrado no teste de IH e a resistência à infecção por CPV. Um título  $\geq 1:80$  é considerado protector contra a infecção por parvovírus, enquanto um título de 1:40 não é protector mas, no caso de se tratar de AOM interfere com a vacinação. Já um título  $\leq 1:10$  parece não interferir com a vacinação mas também não é protector (Truyen, 2006; Pratelli et al., 2000).

A principal causa de falha vacinal é a interferência pelos AOM (Greene & Decaro, 2012). Por isso, as diretrizes da WSAVA recomendam que o último reforço seja feito pelas 14-16 semanas, quando a maioria dos cachorros já não possui AOM suficientes para interferir na resposta imunitária (WSAVA; 2010). Neste sentido, a medição do título de Ac neutralizantes por IH pode revelar-se útil, quer para delimitar o início da “janela de susceptibilidade” para o CPV e, conseqüentemente, o início adequado da primovacinação, quer para avaliar a necessidade de novos reforços vacinais (Coyne et al., 2001; Prittie, 2004).

Outro problema relativamente à vacinação prende-se com a existência, ou não, de protecção cruzada entre as várias estirpes. De facto, a protecção conferida pelas vacinas correntes (baseadas em CPV-2) permanece um motivo de estudo. Muitos autores acreditam que estas vacinas são capazes de induzir protecção contra as estirpes circulantes (Greenwood, Chalmers, Baxendale & Thompson, 1995; Schultz, 2008; Spibey et al., 2008; Larson & Schultz, 2008; Siedek, Schmidt, Sture & Raue, 2011), enquanto outros defendem que a imunidade por elas conferida é aceitável para vírus homólogos, mas inferior para as estirpes evolutivas (Cavalli et al., 2008; Martella et al., 2005), o que faz com que o CPV-2c, por exemplo, seja capaz de causar doença a animais “correctamente” vacinados (Decaro et al., 2008). No entanto, apesar de todos os casos descritos de falha vacinal, não há uma evidência definitiva para a ausência de protecção cruzada entre estirpes. Além disso, como já foi referido, a principal causa de falha vacinal está ligada à presença de AOM em cachorros ou a um mau funcionamento do sistema imunitário em cães adultos (Decaro & Buonavoglia, 2012; Greene & Decaro, 2012).

## **6.6. Resposta imunitária contra o parvovírus canino**

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, necessitando da célula-alvo para se replicar. A imunidade contra os vírus inicia-se com as barreiras físicas do organismo. Depois, os vírus têm de ultrapassar outros mecanismos de imunidade inata, como os interferões, as células NK e as células fagocitárias (neutrófilos, macrófagos, células NK e células dendríticas). Os interferões fazem parte de um conjunto de proteínas, envolvidos na resposta específica e inespecífica. São produzidos por células infectadas por vírus, difundindo-se depois para células vizinhas onde as estimulam a produzir proteínas antivirais que bloqueiam a replicação viral. Assim, o interferão limita o alastramento do vírus de célula para célula e activa células NK, que reconhecem e destroem células tumorais e células infectadas por vírus (Nash, 1996; Lydyard, Whelan & Fanger, 2000).

Com o decorrer da infecção desenvolve-se a imunidade adaptativa, incluindo mecanismos celulares e humorais, dependendo da fase de infecção. Os vírus apresentam uma fase intracelular, na qual se replicam e uma fase extracelular, na qual se disseminam e procuram novas células-alvo (Male & Roitt, 1996). Assim, os Ac constituem a maior barreira à disseminação do vírus pela corrente sanguínea, através da sua neutralização e activação do sistema de complemento. Por outro lado, os linfócitos T têm a capacidade de reconhecer células infectadas por vírus, ligando-se a elas e destruindo-as (Nash, 1996).

A memória imunológica é uma característica importante da resposta imunitária adquirida. O sistema imunitário está preparado para reconhecer uma grande variedade de Ag. Quando o antigénio se liga a um linfócito (B ou T) capaz de o reconhecer, este é induzido a proliferar rapidamente. Durante este processo de selecção clonal, os linfócitos sofrem uma série de ciclos celulares, até se transformarem em células maduras. Dentro de poucos dias passa a existir um número suficiente de células prontas a montar uma resposta imunitária adequada (células efectoras). Mesmo após a infecção ter sido debelada, alguns destes linfócitos recentemente produzidos permanecem no organismo (células-memória), o que permite ao sistema imunitário reconhecer o mesmo Ag, caso ele penetre novamente no organismo, de forma mais rápida, intensa e duradoura (Male & Roitt, 1996). A memória imunitária é específica de cada Ag e constitui o fundamento da vacinação, sendo por isso uma característica importante na dinâmica de infecção pelo CPV.

## **7. Estarão os cães com neoplasias e/ou submetidos a terapêutica antineoplásica devidamente protegidos contra a reactivação ou desenvolvimento de novas infecções?**

Várias podem ser as situações envolvidas no comprometimento da função imunitária, sendo as neoplasias e seus tratamentos factores imunodepressores sobejamente conhecidos em medicina humana. Esta combinação, juntamente com a frequente exposição a locais de risco (como os hospitais), coloca os pacientes oncológicos em perigo de desenvolver infecções oportunistas graves.

Os estudos de função imunitária realizados em pacientes oncológicos veterinários são escassos e de conclusões controversas, afastando-se por vezes do que se verifica no Homem. Além disso, considerando que a maioria dos agentes clinicamente relevantes (como o CPV) é específica de espécie, não seria correcta a extrapolação definitiva desta informação da medicina humana (Henry, et al., 2001). Assim, torna-se importante o conhecimento do efeito das neoplasias, principalmente as hematopoiéticas, e respectivos tratamentos no sistema imunitário de pacientes veterinários, de forma a avaliar a necessidade de instituição de medidas profiláticas e a definição de protocolos vacinais pós-quimioterapia adequados. No fundo, importa saber se estes animais mantêm a capacidade de montar uma resposta imunitária primária contra novos agentes patogénicos e a capacidade de montar uma resposta imunitária secundária que os proteja contra a reactivação de agentes vacinais ou se, pelo contrário, passam a correr os mesmos riscos que animais não vacinados.

Além disso, se animais correctamente vacinados não forem capazes de manter títulos de Ac protectores após tratamento quimioterápico, podem surgir problemas de saúde pública no que se refere a infecções zoonóticas ou facilmente dissemináveis. Assim, é necessário conhecer o efeito destes tratamentos na resposta imunitária, não só para prevenir a doença no animal, como para impedir a sua disseminação.



### III. TRABALHO EXPERIMENTAL

#### 1. Introdução/Objectivos

Actualmente, a administração de fármacos citotóxicos é frequente em medicina veterinária e, embora seja uma arma eficaz contra processos neoplásicos, pode comportar alguns efeitos secundários, como referido anteriormente. Algumas neoplasias, como as hematopoiéticas, podem também ter um efeito imunodepressor. Desta forma, é de esperar que a combinação entre neoplasia e tratamento quimioterápico nos nossos animais aumente o risco face a determinadas doenças infecciosas, tal como acontece em medicina humana.

Este trabalho pretende contribuir para o estudo desta temática, visto serem escassas e, por vezes, contraditórias, as conclusões tiradas até à data. Para isso, propusemo-nos verificar quais as alterações ocorridas em cães sujeitos a quimioterapia para uma das mais frequentes neoplasias caninas, o linfoma, no que se refere à dinâmica de infecção por uma doença prevenida por vacinação, a parvovirose canina. Esta avaliação teve como base a carga viral do CPV e a sua excreção nas fezes, bem como a respectiva resposta humoral. Outro dos objectivos deste trabalho foi determinar se o linfoma *per se* é capaz de influenciar a resposta à infecção pelo CPV, sendo para isso realizadas colheitas imediatamente antes da primeira sessão de quimioterapia (T0), cujos valores foram comparados com os de um grupo controlo de animais saudáveis. Finalmente, foi ainda avaliada a carga e a excreção viral em animais com diagnóstico clínico de parvovirose, de forma a obter o respectivo perfil e assim comparar os resultados obtidos com o grupo de pacientes oncológicos.

O CPV foi usado como modelo viral, tendo sido escolhido pela elevada prevalência no nosso país e nos nossos cães, pela existência de muitos animais portadores e pela fácil detecção/monitorização. Embora não existam registos do aparecimento desta entidade clínica como consequência de tratamentos quimioterápicos, este trabalho pode servir de base para o estudo (a nível nacional e internacional) de outros vírus potencialmente mais perigosos e/ou clinicamente mais relevantes, como por exemplo o herpesvírus canino, o vírus da esgana e o vírus da raiva.

## 2. Material e Métodos

### Animais

Para a realização deste estudo, foram incluídos cães de qualquer raça, género ou idade, com diagnóstico confirmado de linfoma através de PAAF (citologia) e/ou histopatologia. Além disso, os pacientes oncológicos deveriam ter um protocolo vacinal para parvovirose canina conhecido. Animais anteriormente sujeitos a tratamentos quimioterápicos ou sujeitos a tratamentos imunomoduladores até 2 semanas antes do início da quimioterapia, foram excluídos do estudo.

Foram estudados 8 cães com linfoma, que realizaram pela primeira vez um protocolo de quimioterapia para a referida neoplasia. Destes animais, 5 foram seguidos no HEFMV-UTL e os restantes no Centro Veterinário de Berna (Oncovet). A amostra foi constituída por 3 fêmeas e 5 machos, entre os 6 e os 11 anos de idade (média de 7,9 anos). Relativamente às raças, foram incluídos 4 Pastores Alemães, 1 Golden Retriever, 1 Dobermann, 1 Labrador Retriever e 1 Boxer (Anexo IV: Tabela 13). Todos os animais foram submetidos a um tratamento quimioterápico baseado no protocolo CHOP: no HEFMV-UTL foi utilizado um protocolo de 25 semanas (Tabela 4); na OncoVet um protocolo de 19 semanas (Tabela 5). Ambos os protocolos são constituídos por quatro ciclos separados por uma semana de intervalo, sendo que a única diferença entre os dois consiste na administração semanal de fármacos no protocolo curto e quinzenal no protocolo longo, durante os dois últimos ciclos. As amostras foram colhidas entre Abril e Outubro de 2012.

No grupo controlo foram incluídos cães considerados saudáveis e com protocolo vacinal para a parvovirose canina conhecido. Animais sujeitos a tratamentos imunomoduladores até 2 semanas antes da colheita das amostras foram excluídos do estudo. A amostra foi então constituída por 8 cães, com tentativa de emparelhamento por idade e raça relativamente ao grupo de pacientes oncológicos. Assim, foram incluídos 3 fêmeas e 5 machos, com idades compreendidas entre os 3 e os 11 anos de idade (média de 7,1 anos). Destes animais, 4 eram de raça Pastor Alemão, 1 Golden Retriever, 1 Dobermann, 1 Labrador Retriever e 1 Boxer (Anexo IV: Tabela 14).

Nenhum dos animais (grupo experimental e controlo) foi vacinado durante o estudo.

Para além destes dois grupos, foi ainda constituído um terceiro que incluiu 8 animais com parvovirose, tratados no HEFMV-UTL durante o decurso do estudo. Este grupo incluiu 3 fêmeas e 5 machos, com idades compreendidas entre os 2,5 e os 10 meses de idade (média de 4,4 meses), sendo que 5 animais eram de raça Dálmata, 2 de raça indeterminada e 1 Bull Terrier (Anexo IV: Tabela 15).

A realização deste estudo foi aprovada pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, UTL, e foi obtido o consentimento escrito dos donos dos animais incluídos.

**Tabela 4:** Protocolo CHOP-25 da Universidade de Wisconsin-Madison (UW-M 25) (adaptado de Chun, 2009)

Semana	Fármaco	Posologia	Semana	Fármaco	Posologia
1	Vincristina	0,7 mg/m <sup>2</sup> IV	8	Vincristina	0,7 mg/m <sup>2</sup> IV
	Prednisolona	2 mg/kg PO SID	9	Doxorrubicina	30 mg/m <sup>2</sup> IV
2	Ciclofosfamida	200 mg/m <sup>2</sup> IV ou PO	11	Vincristina	0,7 mg/m <sup>2</sup> IV
	Prednisolona	1,5 mg/kg PO SID	13	Ciclofosfamida	200 mg/m <sup>2</sup> IV ou PO
3	Vincristina	0,7 mg/m <sup>2</sup> IV	15	Vincristina	0,7 mg/m <sup>2</sup> IV
	Prednisolona	1 mg/kg PO SID	17	Doxorrubicina	30 mg/m <sup>2</sup> IV
4	Doxorrubicina	30 mg/m <sup>2</sup> IV	19	Vincristina	0,7 mg/m <sup>2</sup> IV
	Prednisolona	0,5 mg/kg PO SID	21	Ciclofosfamida	200 mg/m <sup>2</sup> IV ou PO
6	Vincristina	0,7 mg/m <sup>2</sup> IV	23	Vincristina	0,7 mg/m <sup>2</sup> IV
7	Ciclofosfamida	200 mg/m <sup>2</sup> IV ou PO	25	Doxorrubicina	30 mg/m <sup>2</sup> IV

**Tabela 5:** Protocolo CHOP-19 da Universidade de Wisconsin-Madison (UW-M 19) (adaptado de Vail & Young, 2007)

Semana	Fármaco	Posologia	Semana	Fármaco	Posologia
1	Vincristina	0,5 mg/m <sup>2</sup> IV	8	Vincristina	0,5 mg/m <sup>2</sup> IV
	Prednisolona	2 mg/kg PO SID	9	Doxorrubicina	30 mg/m <sup>2</sup> IV
2	Ciclofosfamida	200 mg/m <sup>2</sup> IV ou PO	11	Vincristina	0,5 mg/m <sup>2</sup> IV
	Prednisolona	1,5 mg/kg PO SID	12	Ciclofosfamida	200 mg/m <sup>2</sup> IV ou PO
3	Vincristina	0,5 mg/m <sup>2</sup> IV	13	Vincristina	0,5 mg/m <sup>2</sup> IV
	Prednisolona	1 mg/kg PO SID	14	Doxorrubicina	30 mg/m <sup>2</sup> IV
4	Doxorrubicina	30 mg/m <sup>2</sup> IV	16	Vincristina	0,5 mg/m <sup>2</sup> IV
	Prednisolona	0,5 mg/kg PO SID	17	Ciclofosfamida	200 mg/m <sup>2</sup> IV ou PO
6	Vincristina	0,5 mg/m <sup>2</sup> IV	18	Vincristina	0,5 mg/m <sup>2</sup> IV
7	Ciclofosfamida	200 mg/m <sup>2</sup> IV ou PO	19	Doxorrubicina	30 mg/m <sup>2</sup> IV

### Amostras

Para este estudo foram colhidas amostras de sangue para avaliação de alguns parâmetros sanguíneos (hemograma) e diagnóstico molecular e serológico do CPV (carga viral no plasma e leucócitos, e detecção de anticorpos plasmáticos anti-CPV). Foram ainda realizadas zaragatoas rectais para avaliação da excreção de ADN viral nas fezes.

Todas as amostras foram processadas no máximo 24 horas após a sua colheita, tendo sido refrigeradas a 4°C até ao momento da manipulação.

### *Cronograma*

No grupo experimental foram colhidas amostras imediatamente antes do início da primeira sessão (T0) e em mais três momentos durante os primeiros 2 ciclos de tratamento, conforme esquematizado na Tabela 6. Como se pode verificar nas Tabelas 4 e 5, os dois

primeiros ciclos são semelhantes em ambos os protocolos CHOP inseridos neste estudo. O intervalo entre a primeira e a última colheita variou entre 57 e 64 dias (média de 59 dias). No grupo controlo, constituído por animais considerados saudáveis, as amostras foram colhidas com a mesma periodicidade, de forma a avaliar os mesmos parâmetros.

**Tabela 6:** Cronograma da recolha das amostras de trabalho

	T0		T1		T2			T3		
Semana / Fármaco	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Vincristina</b>	X		X			X		X		
<b>Ciclofosfamida</b>		X					X			
<b>Doxorrubicina</b>				X					X	
<b>Prednisolona</b>	X	X	X	X						

#### *Hemograma*

Para cada hemograma, foi colhido 1mL de sangue para tubo com ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA). Os hemogramas associados ao tratamento antineoplásico são análises de controlo realizadas por rotina antes de cada sessão de quimioterapia, tendo sido realizados no Laboratório de Análises Clínicas Prof. Braço Forte, FMV-UTL.

#### *Diagnóstico molecular e serológico do CPV*

Para este propósito foram colhidos 2mL de sangue em EDTA para processamento no Laboratório de Virologia da FMV-UTL.

O sangue em EDTA foi centrifugado a 2400xg durante 10 minutos, de modo a separar o plasma das células sanguíneas. O plasma obtido foi alicotado (200µL) e armazenado a -80°C até processamento.

A porção celular foi submetida a uma lise de eritrócitos com um tampão de lise (*Erythrocyte Lysis Buffer – Buffer EL, Qiagen®*). Para isso, as células sanguíneas foram homogeneizadas com 5 volumes de tampão EL (em relação ao volume de sangue total) e incubadas em gelo durante 15min. Depois, a solução foi centrifugada a 500xg durante 10min a 4°C e descartado o sobrenadante. Realizou-se outra lavagem do *pellet* celular com 2 volumes de tampão EL e nova centrifugação. Removeu-se o sobrenadante e homogeneizou-se com: (1) 200µL de PBS (*Phosphate buffered saline*) nos casos em que a extracção de ADN foi feita de imediato; (2) 200µL de uma solução de soro fetal com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) nos casos em que a extracção não foi realizada de imediato, tendo por isso as amostras sido conservadas a -80°C até extracção (informação mais detalhada pode ser encontrada no manual do *kit QIAamp® RNA Blood - Qiagen®*).

As zaragoas rectais foram homogeneizadas em 300µL de PBS e armazenadas a -80°C até extracção do ADN.

### *Extracção e Quantificação do ADN*

Para a extracção de ADN viral (plasmas e zaragatoas rectais) e total (leucócitos) foi utilizado um *kit* comercial (*DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue - Qiagen<sup>®</sup>*) de acordo com as instruções do fabricante.

De uma maneira geral, os leucócitos foram lisados com 20µL de proteinase K e 200µL de tampão desnaturante (tampão AL), tendo a solução sido incubada a 56°C durante 15min. Depois, foram adicionados 200µL de etanol absoluto para precipitação dos ácidos nucleicos e o lisado foi colocado numa coluna de sílica (*DNeasy Mini spin column*) para fixação selectiva e de alta afinidade do ADN desidratado. Foram posteriormente realizadas lavagens e centrifugações sucessivas com os tampões fornecidos no *kit* (500µL de tampão AW<sub>1</sub> e 500µL de tampão AW<sub>2</sub>) e o ADN fixo na coluna foi eluído para um tubo identificado, com 200µL de tampão AE (tampão de eluição hidratante).

A extracção de ADN viral das amostras de plasma e zaragatoas rectais foi realizada de forma semelhante, excepto em dois momentos do processamento: (1) em vez de 20µL de proteinase K, foi adicionada a mesma quantidade de protease; (2) a eluição final foi feita com 60µL de tampão AE, em vez de 200µL.

Após extracção do ADN, foi efectuada a sua quantificação no aparelho *Nanodrop 2000c Spectrophotometer<sup>®</sup>* (*Thermo Fisher Scientific*) e as amostras armazenadas a -80°C até realização do *qPCR*.

### *Detecção e Quantificação da carga viral*

A detecção e quantificação da carga viral (em moléculas/µL) foram realizadas através da técnica de *qPCR*. Este método baseia-se na técnica de PCR e utiliza um par de *primers* ou iniciadores para amplificar várias cópias de uma sequência de ADN, o que permite a detecção em tempo real da amplificação da sequência alvo.

As reacções de *qPCR* foram realizadas num termociclador (*Real-time 7300 - Applied Biosystems*) que efectuou a medição da emissão de fluorescência, indicativa da amplificação e quantificação da região alvo. Neste trabalho recorreu-se à tecnologia *TaqMan<sup>®</sup>* da *Applied Biosystems*, na qual se utiliza um terceiro *primer* (sonda) específico e marcado com um fluoróforo (*reporter*) na extremidade 5' e um *quencher* na extremidade 3'. Enquanto não ocorre ligação da sonda à região correspondente do ADN (delimitada pelos *primers forward* e *reverse*), o *reporter* e o *quencher* mantêm-se próximos e o *quencher* inibe a emissão de fluorescência pelo *reporter*. Após a ligação da sonda e dos *primers* à sequência alvo, a actividade da exonuclease 5'-3' da Taq polimerase hidrolisa a sonda, induzindo o conseqüente afastamento entre o *reporter* e o *quencher*, levando à emissão de fluorescência. A intensidade da fluorescência emitida no final de cada ciclo é proporcional à quantidade de produto final amplificado, sendo apresentada num gráfico que permite monitorizar, em tempo real, a cinética da reacção de amplificação. Se a sequência alvo não

está presente, não há ligação da sonda e, conseqüentemente, não ocorre emissão de fluorescência (Van Guilder, Vrana & Freeman, 2008).

Os *primers* e a sonda *TaqMan*<sup>®</sup> foram calculados através do programa *Primer designing tool* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Tabela 7). A sua concentração final na reação de amplificação foi de 0,9 µM para o *primer forward* e para o *primer reverse* e 0,25 µM para a sonda. As reações de amplificação foram efetuadas no volume final de 20µL e a quantidade de ácido nucleico utilizada para cada amostra foi de 50ng. Os *primers* foram escolhidos com base na sequência nucleotídica do gene *vp1*, disponível no GenBank através do seu número de acesso (NA) AB437433.1. Os ciclos térmicos utilizados no *qPCR* foram os seguintes: 10 min a 95°C para a desnaturação, 15 segundos a 90°C para o *annealing* e 1 min a 60°C para a extensão, num total de 50 ciclos.

**Tabela 7:** *Primers* e sonda utilizados no *qPCR* para amplificação da sequência de CPV, sua localização e dimensão dos fragmentos obtidos

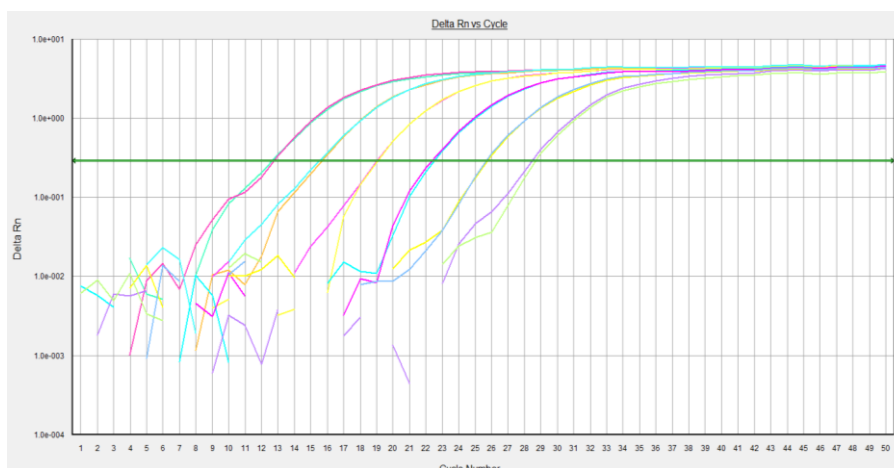
<i>Primers e sonda</i>	Sequência (5' → 3')	Fragmento
<i>Forward</i>	GGGCCTGGGAACAGTCTTGACC	99pb
<i>Reverse</i>	ACCAGAGCGAAGATAAGCAGCGT	
Sonda	<b>FAM</b> AGAACCAACTAACCCCTTCTGACGCCGC <b>TAMRA</b>	

Como controlo positivo, foi utilizada uma diluição da estirpe de CPV presente na vacina Tetradog<sup>®</sup> (CPV-2 Cornell-780916). A construção do plasmídeo recombinante foi realizada por ligação do produto de PCR, com 50ng de plasmídeo pGEM (Promega), na presença de T4ADN ligase, a 4°C durante a noite. Esta ligação foi posteriormente utilizada para transformar células competentes (*E. Coli* DH5α), as quais foram plaqueadas em meio LB amp suplementado com IPTG e Xgal e incubadas durante 24h. Em seguida, as colónias brancas foram repicadas e foi confirmada a presença do plasmídeo recombinante nas células através de *qPCR*. Os clones recombinantes positivos foram posteriormente armazenados em LB e glicerol (1:1) a -80°C. Para extração do ADN plasmídico utilizou-se um *kit* comercial, de acordo com as instruções do fabricante, baseado no processo de lise alcalina. O plasmídeo foi sequenciado pela empresa STABvida Portugal, para confirmação do producto clonado, tendo sido utilizado posteriormente como controlo positivo da reação.

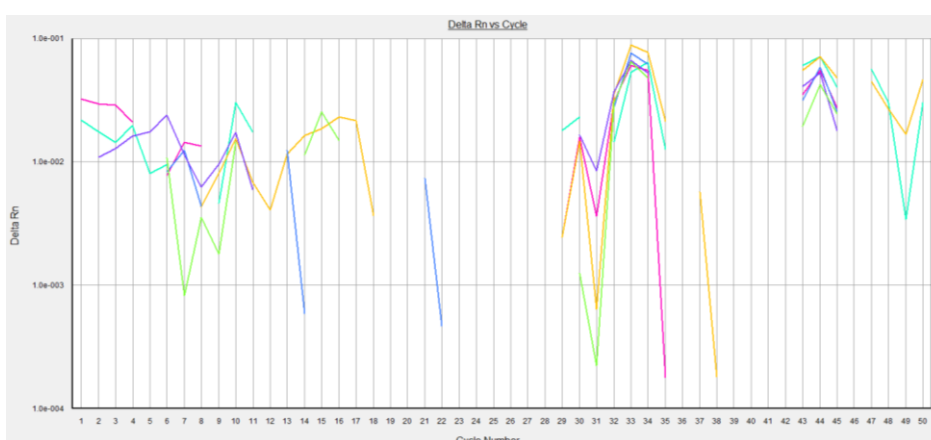
Como controlo negativo recorreu-se ao uso de água Milli-Q estéril.

As provas apenas foram validadas quando se obteve amplificação dos controlos positivos (*standard*) e quando não se observou amplificação nos controlos negativos, indicativa de contaminação (Figura 3 e 4).

**Figura 3:** Curvas de amplificação das diluições do controlo positivo (*standard*) (original)



**Figura 4:** Curvas de amplificação dos controlos negativos (original)



#### *Determinação do título de anticorpos anti-PVC*

O título de anticorpos (Ac) plasmáticos anti-PVC foi obtido através de uma prova de ELISA indirecta e semiquantitativa. Para isso, foi utilizado o *kit* comercial TiterCHEK<sup>®</sup> CDV/CPV da *Synbiotics* (*Zoetis*), que tem a particularidade de apenas permitir uma reacção colorimétrica no caso de o título de Ac da amostra ser superior ao título considerado protector (1:80 no caso do CPV), com elevada sensibilidade e especificidade (Litster, Pressler, Volpe & Dubovi, 2012).

De uma forma geral, nesta técnica é utilizado um suporte sólido (uma placa de polistireno), ao qual o antigénio (Ag) foi adsorvido (neste caso proteínas do CPV). O plasma é adicionado e incubado para que, caso possua Ac específicos contra o CPV, estes se liguem ao Ag da placa. Segue-se depois uma lavagem que elimina todo o material não ligado e acrescenta-se um Ac secundário (uma Ig antiespécie ligada a uma enzima, o conjugado), seguido de incubação. Após nova lavagem, o substrato cromogénico é adicionado, ocorrendo uma reacção colorimétrica no caso de a reacção ser positiva. Assim, neste *kit*, a presença de cor (de intensidade igual ou superior ao controlo positivo) indica a presença de Ac anti-CPV acima do título protector, enquanto a ausência de cor (ou a presença de cor de

intensidade inferior ao controlo positivo) indica a ausência de Ac anti-CPV ou a presença dos mesmos abaixo do título protector.

### Análise Estatística

A análise dos dados obtidos foi realizada através do programa de análise estatística R (Institute for Statistics and Mathematics, 2012).

A distribuição dos dados foi analisada com o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e, no caso de não apresentarem distribuição normal, foram transformados logaritmicamente. No caso de, após transformação, a normalidade não ter sido conseguida, foram utilizadas as alternativas não-paramétricas correspondentes.

Neste trabalho, cada indivíduo foi avaliado para cada parâmetro mais do que uma vez e não é possível assumir independência entre os resultados ao longo do tempo. Assim, tanto os parâmetros do hemograma, como número de moléculas de CPV nos leucócitos, plasma e fezes foram sujeitos a uma análise de variância com medidas repetidas, através de uma ANOVA mista inter-intra sujeitos ou Split Plot ANOVA. Este modelo permite testar os efeitos principais de cada variável independente (grupo e tempo), bem como avaliar a existência de uma interação estatisticamente significativa entre elas. O Split Plot ANOVA foi posteriormente complementado com um teste Tukey para comparações múltiplas (teste post-hoc), para identificar quais as médias significativamente diferentes entre si.

A correlação entre os parâmetros do hemograma e a correlação entre o número de moléculas de CPV nos leucócitos, plasma e fezes foram avaliadas através do teste de correlação de Spearman.

Diferenças significativas no número de moléculas de CPV nos leucócitos, plasma e fezes antes do início da quimioterapia (T0), entre o grupo experimental e o grupo controlo, foram aferidas utilizando o teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney. A mesma análise foi feita em relação aos parâmetros do hemograma, tendo o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney sido substituído pelo teste T de amostras independentes na análise de variáveis com distribuição normal.

A comparação entre os 3 grupos estudados, no que se refere à média do número de moléculas de CPV nos leucócitos, plasma e fezes, foi realizada através de uma análise de variância (One-Way ANOVA), seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas.

A associação entre o grupo (oncológico, controlo e de cães com parvovirose) e a presença de um título protector de Ac plasmáticos anti-CPV ( $\geq 1:80$ ) foi analisada através de tabelas de contingência e da realização do teste de Fisher.

Em todas as análises realizadas, foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

## IV. RESULTADOS

### 1. Caracterização da amostra

Neste trabalho foram avaliados 24 cães, divididos em 3 grupos experimentais (Anexo IV).

Dos 8 cães incluídos no grupo oncológico, 5 (62,5%) foram submetidos ao protocolo CHOP-longo (25 semanas) e 3 (37,5%) foram submetidos ao protocolo CHOP-curto (19 semanas). Na presença de sinais indicativos de toxicidade farmacológica, como anorexia, vômito, diarreia, prostração grave, anemia, neutropénia ou trombocitopénia, o tratamento foi interrompido por uma semana (até normalização do estado clínico), ou substituído por um fármaco menos tóxico pertencente ao protocolo utilizado. Nos animais que apresentaram sinais de resistência aos fármacos utilizados, foi administrado um fármaco de resgate (L-asparaginase: 400 UI/Kg SC). Durante o decurso do estudo, 2 dos animais (25%) (animais B e G) atrasaram a administração pelos motivos referidos e 2 (25%) (animais F e G) necessitaram da administração de L-asparaginase. O animal B apresentou vômito e diarreia na 2ª semana de tratamento (tendo recuperado a tempo da 3ª sessão) e anorexia na 8ª semana (razão pela qual adiou a administração de vincristina uma semana). O animal E apresentou um episódio de vômito e inapetência na 7ª semana, tendo igualmente recuperado a tempo da sessão seguinte. O animal G apresentou anorexia na 4ª semana, pelo que repetiu a administração de vincristina (evitando assim a administração de doxorubicina, mais tóxica). Dos animais estudados, 4 (50%) faleceram após o período de colheitas, sendo que 3 destes (37,5%) foram eutanasiados devido à deterioração do estado clínico. Os cães deste grupo apresentavam idades compreendidas entre os 6 e os 11 anos de idade (média de 7,9 anos).

O grupo controlo foi constituído por 8 cães, com tentativa de emparelhamento por idade e raça relativamente ao grupo de pacientes oncológicos. Os canídeos tinham idades compreendidas entre os 3 e os 11 anos (média de 7,1 anos).

Todos os cães do grupo oncológico e do grupo controlo estavam vacinados para a parvovirose. No grupo oncológico, 7 cães (87,5%) tinham sido vacinados há menos de 1 ano (animais A, C, D, E, F e G) e 1 (12,5%) há mais de 3 anos (animal B). No grupo controlo, 4 (50%) tinham sido vacinados há menos de 1 ano (animais L, N, O e Q), 3 (37,5%) há menos de 2 anos (animais I, M e P) e 1 (12,5%) há mais de 2 anos (animal J).

Finalmente, os 8 cães com parvovirose tinham idades compreendidas entre os 2,5 e os 10 meses (média de 4,4 meses). Nenhum destes animais estava vacinado contra a parvovirose e 3 (37,5%) sucumbiram à doença.

## 2. Hemograma

Os resultados dos hemogramas realizados podem ser encontrados no Anexo V.

Contudo, apenas o hematócrito, plaquetas, leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos foram alvo de análise estatística.

Dos animais submetidos a quimioterapia, 7 (87,5%) apresentaram uma anemia ligeira (Htc: 30-37%) normocítica e normocrômica, pelo menos uma vez ao longo do estudo (animais A, B, C, D, F, G, H). Um destes animais (12,5%) chegou a apresentar uma anemia moderada (Htc: 20-29%) normocítica e normocrômica (animal F). Relativamente ao grupo controlo, apenas um animal (12,5%) apresentou uma ligeira diminuição do hematócrito (animal Q, Htc: 36,90%), que não foi valorizada como indicativa de anemia.

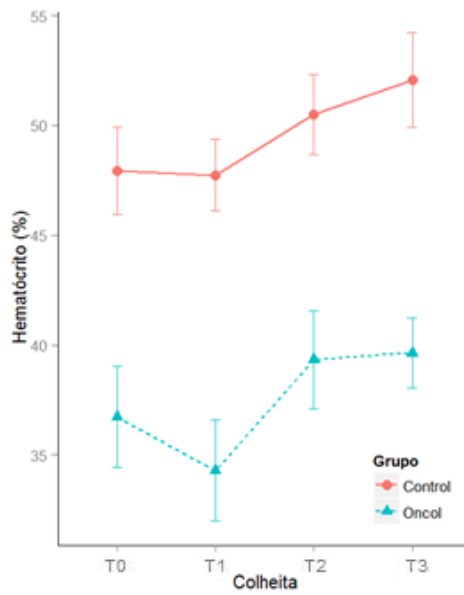
Metade dos animais do grupo oncológico apresentou trombocitose pelo menos uma vez ao longo do estudo (animais A, B, G e H), sendo que um deles também apresentou trombocitopénia (animal G). Dos animais saudáveis nenhum apresentou trombocitose, tendo 6 (75%) apresentado trombocitopénia pelo menos uma vez (animais I, J, L, M, P e Q). É de referir que a trombocitopénia aqui mencionada não inclui os animais com evidências de agregação plaquetária.

Relativamente ao leucograma do grupo oncológico, 7 animais (87,5%) apresentaram leucocitose, pelo menos uma vez ao longo do estudo (animais A, B, C, D, E, G e H), tendo 4 (50%) apresentado leucopénia (animais A, B, C e F). Sete animais (87,5%) apresentaram neutrofilia, pelo menos uma vez (animais A, B, C, D, E, F e H), sendo que um deles (12,5%) também apresentou neutropénia (animal F). A linfopénia ocorreu em 3 animais (37,5%) (animais A, B e D), tendo um deles (12,5%) também exibido linfocitose (animal D). Finalmente, 6 canídeos (75%) apresentaram monocitose (animais B, C, D, E, G e H). Assim, 6 animais (75%) apresentaram leucocitose por neutrofilia (animais A, B, C, D, E e H), um (12,5%) também por linfocitose (animal D) e 5 (62,5%) por monocitose (animais B, C, E, G e H). As leucopénias ocorridas foram consequência de neutropénia num animal (12,5%) (animal F) e de linfopénia noutra (12,5%) (animal A). No grupo controlo, nenhum animal apresentou alterações do leucograma.”

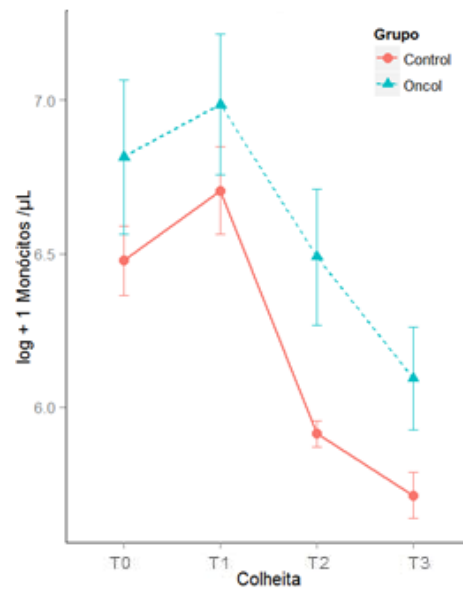
### 2.1. Variação do hemograma dos grupos oncológico e controlo ao longo do tempo

Relativamente ao hematócrito e aos monócitos, observou-se uma diferença significativa entre o grupo oncológico e o grupo controlo ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente), e uma diferença significativa ao longo do tempo ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). Contudo, não se verificou uma diferença significativa na forma como os dois grupos evoluíram ( $p = 0,862$  e  $p = 0,867$ , respectivamente), ou seja, a interacção entre o grupo e o momento da colheita não influenciou significativamente os valores encontrados (Gráficos 1 e 2).

**Gráfico 1:** Hematócrito dos animais dos grupos oncológico e controlo, ao longo do tempo

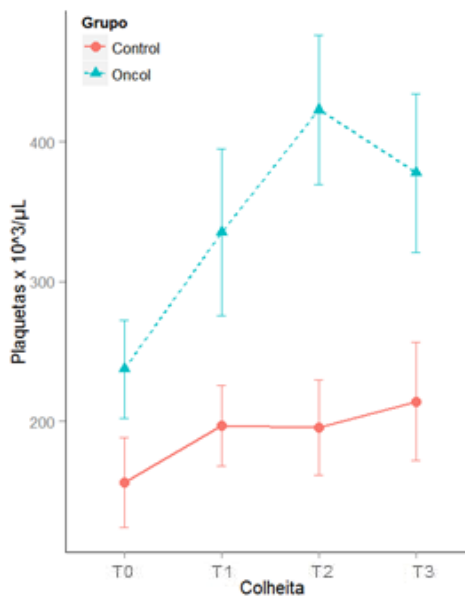


**Gráfico 2:** Monócitos (log+1) dos animais dos grupos oncológico e controlo, ao longo do tempo

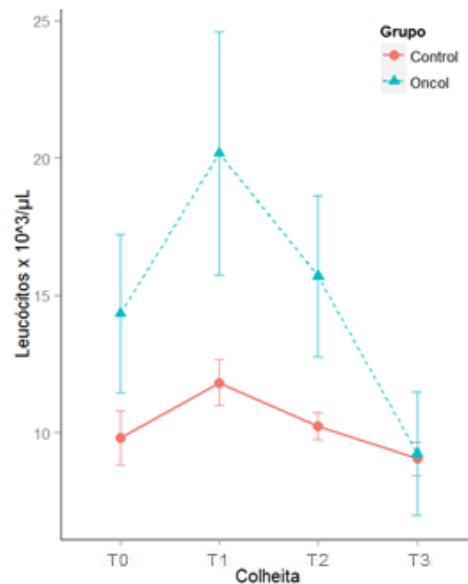


Com as plaquetas e os leucócitos também se verificou uma diferença significativa entre grupos ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente), mas não se observou uma variação significativa ao longo do tempo ( $p = 0,0545$  e  $p = 0,11$ , respectivamente), nem no modo como os dois grupos evoluíram ( $p = 0,398$  e  $p = 0,52$ , respectivamente) (Gráficos 3 e 4).

**Gráfico 3:** Plaquetas dos animais dos grupos oncológico e controlo, ao longo do tempo

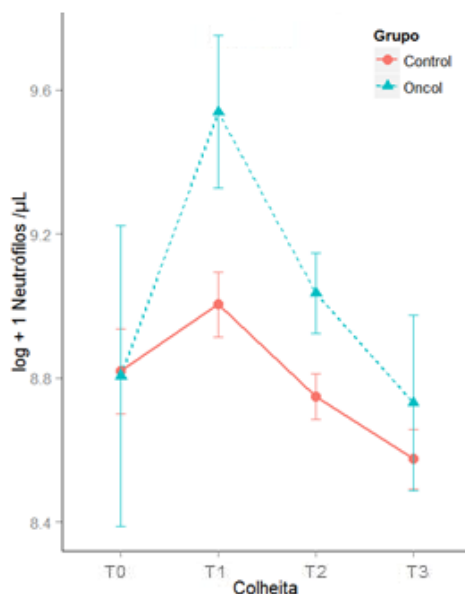


**Gráfico 4:** Leucócitos dos animais dos grupos oncológico e controlo, ao longo do tempo

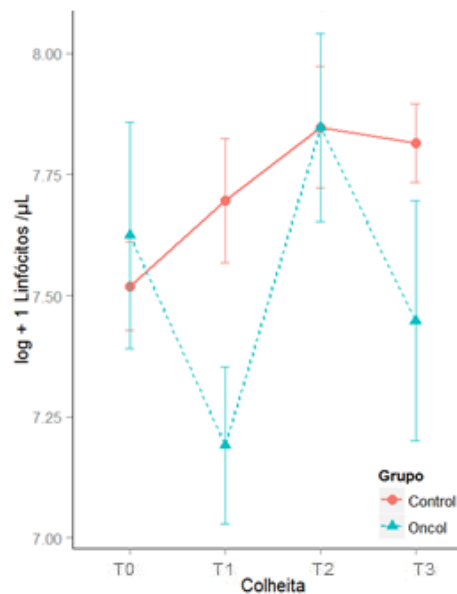


Os valores de neutrófilos e linfócitos encontrados no grupo oncológico não diferiram significativamente dos valores encontrados nos animais saudáveis ( $p=0,127$  e  $p=0,238$ , respectivamente). Também não se observou uma variação significativa ao longo do tempo ( $p=0,0637$  e  $p=0,158$ , respectivamente), nem uma influência significativa da interação entre o grupo e o momento de colheita ( $p=0,6806$  e  $p=0,267$ , respectivamente) (Gráficos 5 e 6).

**Gráfico 5:** Neutrófilos (log+1) dos animais dos grupos oncológico e controlo, ao longo do tempo



**Gráfico 6:** Linfócitos (log+1) dos animais dos grupos oncológico e controlo, ao longo do tempo



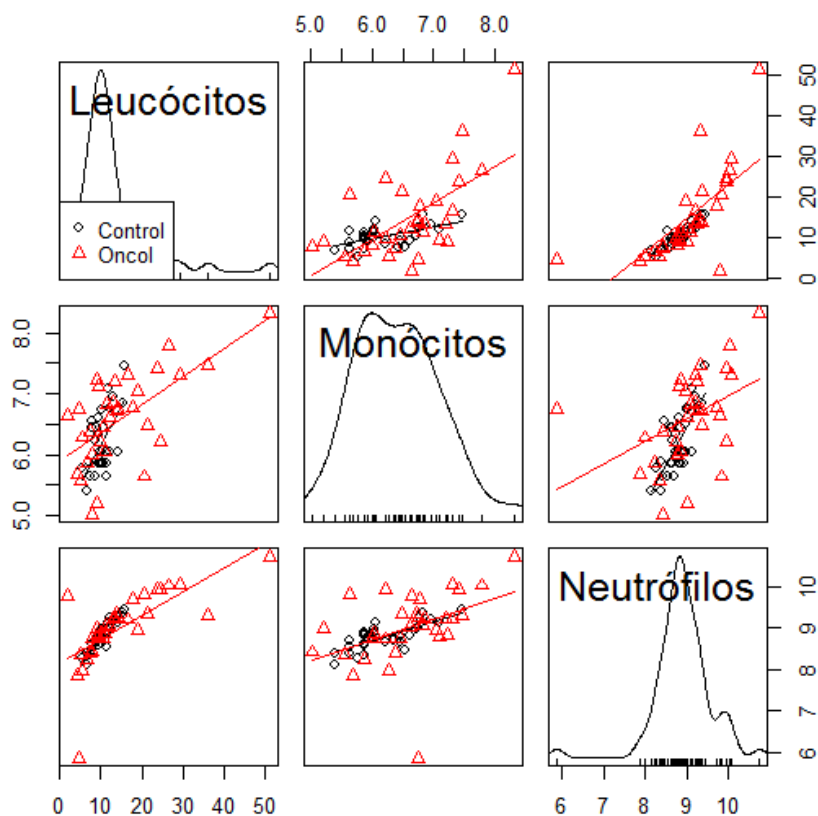
Através da análise dos gráficos 1 a 6, verifica-se a ocorrência de oscilações dos vários parâmetros do hemograma ao longo do tempo. Contudo, nos animais do grupo oncológico, nenhum dos parâmetros sofreu uma variação significativa o longo do tempo (hematócrito  $p=0,238$ ; plaquetas  $p=0,165$ ; leucócitos  $p=0,273$ ; neutrófilos  $p=0,293$ ; linfócitos  $p=0,242$ ; monócitos  $p=0,0887$ ). Assim, a variação significativa encontrada no hematócrito e monócitos dos dois grupos ao longo do tempo resulta de uma variação significativa destes parâmetros no grupo controlo.

## 2.2. Correlação entre os parâmetros do hemograma

No hemograma dos animais submetidos a quimioterapia foram observadas correlações moderadas entre o número de leucócitos e de monócitos ( $p=0,61$ ;  $p<0,001$ ) e entre o número de monócitos e de neutrófilos ( $p=0,54$ ;  $p<0,01$ ). Foi também encontrada uma forte correlação entre o número de leucócitos e de neutrófilos ( $p=0,82$ ;  $p<0,001$ ) (Gráfico 7).

Nos animais saudáveis foram observadas correlações moderadas entre o número de leucócitos e de linfócitos ( $p=0,39$ ;  $p<0,05$ ) e entre o número de leucócitos e de monócitos ( $p=0,56$ ;  $p<0,001$ ). Foram também encontradas correlações fortes entre o número de leucócitos e de neutrófilos ( $p=0,89$ ;  $p<0,001$ ) e entre o número de monócitos e de neutrófilos ( $p=0,70$ ;  $p<0,001$ ) (Gráfico 7).

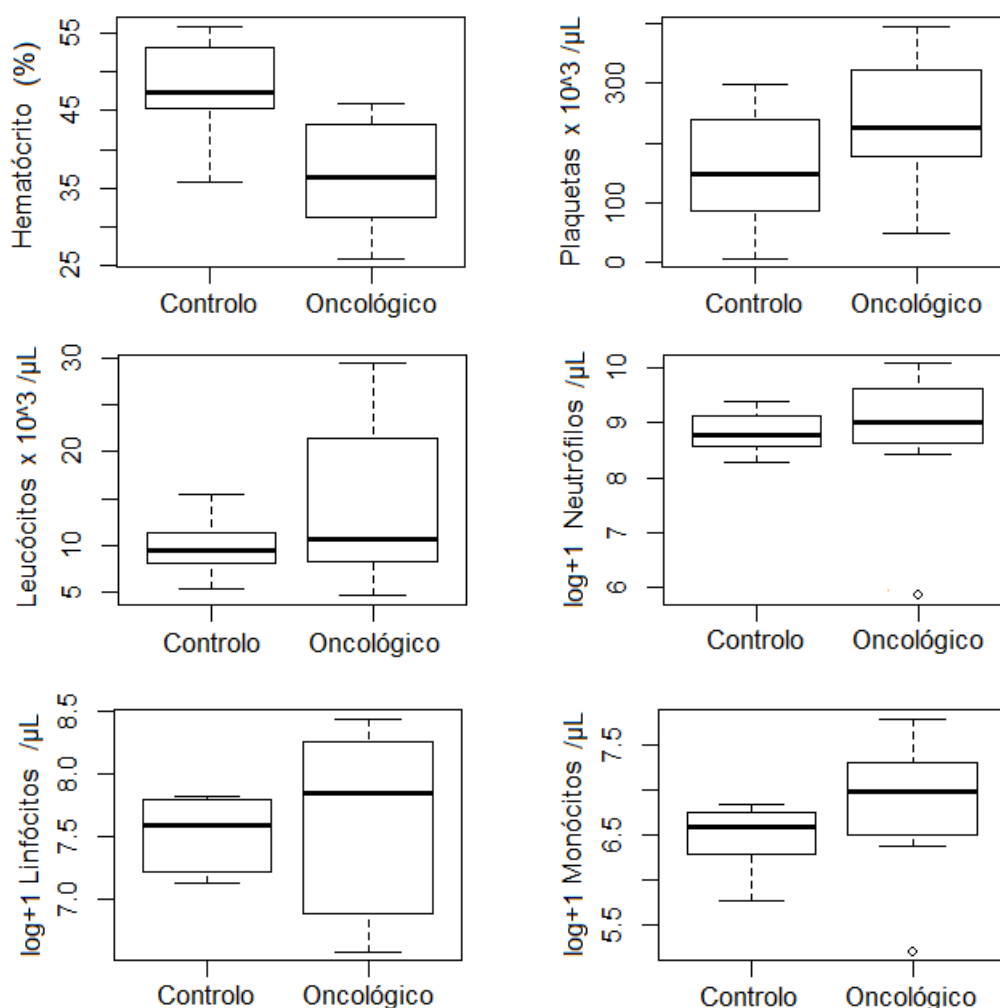
**Gráfico 7:** Correlações fortes encontradas entre o número de leucócitos  $\times 10^3/\mu\text{L}$ , neutrófilos/ $\mu\text{L}$  (log+1) e monócitos/ $\mu\text{L}$  (log+1), no grupo oncológico e no grupo controle



### 2.3. Influência do linfoma no hemograma

Para tentar identificar o efeito desta neoplasia hematopoiética nos resultados obtidos, foram colhidas e analisadas amostras dos animais com linfoma imediatamente antes do início da quimioterapia (T0), para comparação com um grupo controle de animais saudáveis. Neste contexto, apenas se observou uma diferença significativa no hematócrito ( $p < 0,01$ ), sendo este significativamente inferior em animais com linfoma, quando comparado com o de animais saudáveis. Nenhum dos outros parâmetros foi significativamente diferente entre grupos (plaquetas  $p = 0,1719$ ; leucócitos  $p = 0,6454$ ; neutrófilos  $p = 0,4418$ ; linfócitos  $p = 0,7151$ ; monócitos  $p = 0,2904$ ) (Gráfico 8).

**Gráfico 8:** Hemograma dos animais do grupo oncológico e do grupo controle, em T0



### 3. Detecção de CPV nos leucócitos, plasma e fezes

Dependendo do momento da análise, o CPV pode ser detectado em leucócitos (fase celular), no plasma (fase de virémia) e nas fezes (fase de excreção).

A realização de *qPCR* nos materiais biológicos referidos revelou a presença de ADN de CPV em pelo menos um material biológico e em pelo menos uma colheita, em todos os cães dos grupos oncológico e controle. No grupo oncológico, o CPV foi detectado nos leucócitos, plasma e fezes de 6 (75%), 8 (100%) e 7 (87,5%) animais, respectivamente, pelo menos uma vez durante o estudo. A mesma análise no grupo controle, revelou a presença de CPV nos leucócitos de 7 animais (87,5%), e no plasma e fezes de 8 (100%) animais. Todos os cães com parvovirose apresentaram ADN de CPV nos três materiais biológicos analisados (Anexo VI).

A carga viral média encontrada nos três materiais biológicos estudados, nos animais submetidos a quimioterapia e nos animais saudáveis, nas várias colheitas realizadas está ilustrada na Tabela 8.

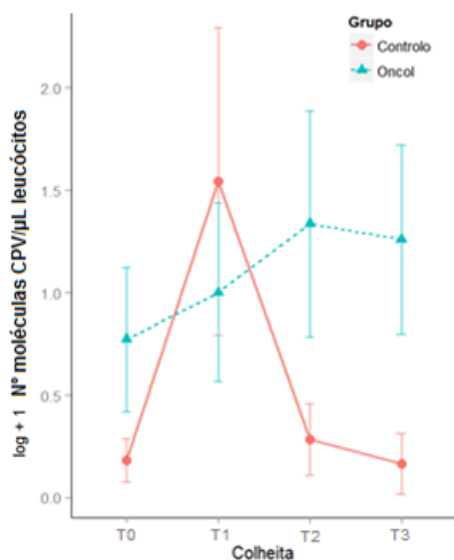
**Tabela 8:** Número médio de moléculas de CPV/ $\mu\text{L}$  (log+1) nos leucócitos, plasma e fezes dos animais estudados, ao longo do tempo

Grupo	Material	T0	T1	T2	T3
Oncológico	Leucócitos	0.772	1.001	1.336	1.259
	Plasma	1.304	1.860	1.507	1.586
	Fezes	0.663	0.535	0.241	0.687
Controlo	Leucócitos	0.182	1.543	0.284	0.166
	Plasma	1.195	4.478	2.937	1.038
	Fezes	1.326	3.043	1.250	0.447

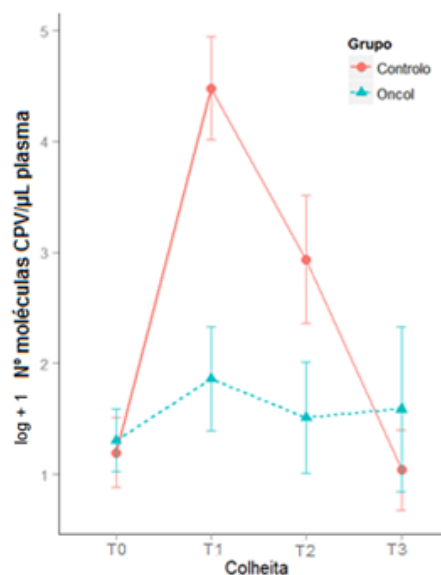
### 3.1. Variação da concentração de CPV nos leucócitos, plasma e fezes dos animais dos grupos oncológico e controlo ao longo do tempo

Relativamente à carga viral encontrada nos leucócitos, não se observou uma diferença significativa entre o grupo oncológico e o grupo controlo ( $p=0,223$ ), nem uma diferença significativa ao longo do tempo ( $p=0,411$ ). Também não se verificou uma diferença significativa na forma como os dois grupos evoluíram ( $p=0,166$ ), ou seja, a interacção entre o grupo e o momento da colheita não influenciou significativamente os valores encontrados (Gráfico 9). No que se refere à carga viral plasmática, foi observada uma diferença significativa entre o grupo oncológico e o grupo controlo ( $p<0,05$ ), e uma diferença significativa ao longo do tempo ( $p<0,01$ ). A interacção entre o grupo e o momento da colheita também influenciou de forma significativa os valores encontrados ( $p<0,05$ ) (Gráfico 10). Finalmente, a carga viral detectada nas fezes foi significativamente diferente entre o grupo oncológico e o grupo controlo ( $p<0,01$ ), variando também significativamente ao longo do tempo ( $p<0,05$ ). Adicionalmente, verificou-se uma influência significativa da interacção entre o grupo e o momento da colheita nos valores encontrados ( $p<0,05$ ) (Gráfico 11).

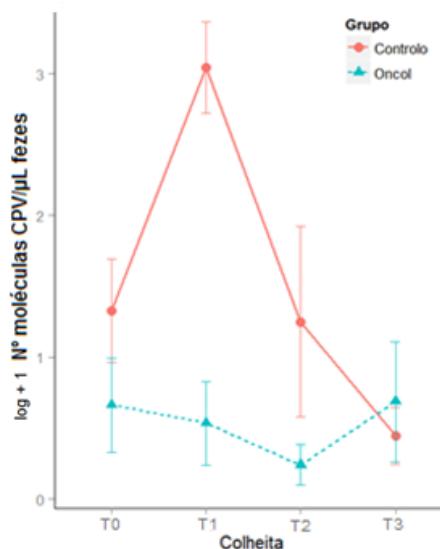
**Gráfico 9:** Número de moléculas de CPV (log+1) nos leucócitos dos animais do grupo oncológico e do grupo controlo, ao longo do tempo



**Gráfico 10:** Número de moléculas de CPV (log+1) no plasma dos animais do grupo oncológico e do grupo controlo, ao longo do tempo



**Gráfico 11:** Número de moléculas de CPV (log+1) nas fezes dos animais do grupo oncológico e do grupo controlo, ao longo do tempo



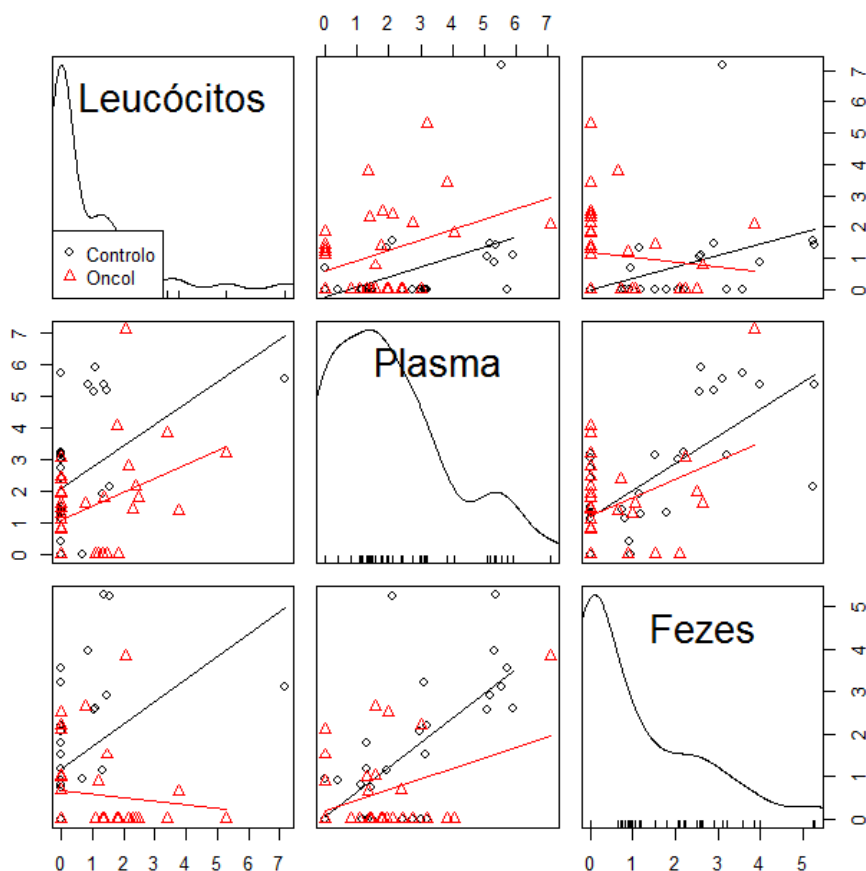
Nos cães com linfoma, o número médio de moléculas de CPV/ $\mu\text{L}$  (log+1) nos leucócitos ( $p=0,716$ ), plasma ( $p=0,983$ ) e fezes ( $p=0,817$ ) não variou significativamente ao longo do estudo. Assim, tal como o mencionado para o hematócrito e os monócitos, a variação significativa encontrada para o número de moléculas de CPV/ $\mu\text{L}$  (log+1) no plasma e nas fezes dos dois grupos, fica a dever-se a uma variação significativa destas variáveis no grupo controlo.

### 3.2. Correlação entre a concentração de CPV nos leucócitos, plasma e fezes

Nos animais com linfoma, não foram observadas correlações entre os três materiais biológicos onde foi pesquisada a presença de CPV.

Pelo contrário, nos animais saudáveis foram encontradas correlações moderadas entre a concentração de CPV nos leucócitos e no plasma ( $\rho=0,47$ ;  $p<0,05$ ), entre a concentração de CPV nos leucócitos e nas fezes ( $\rho=0,66$ ;  $p<0,001$ ) e entre a concentração de CPV no plasma e nas fezes ( $\rho=0,66$ ;  $p<0,001$ ) (Gráfico 12).

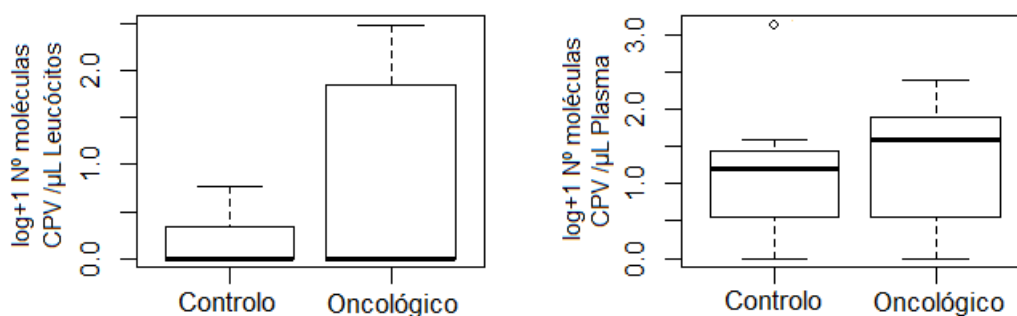
**Gráfico 12:** Correlação entre o número de moléculas de CPV/ $\mu\text{L}$  ( $\log+1$ ) nos leucócitos, plasma e fezes, no grupo oncológico e no grupo controle



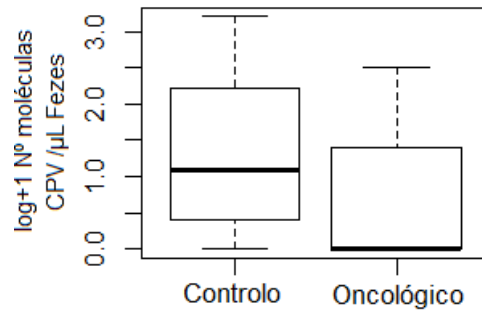
### 3.3. Influência do linfoma na concentração de CPV nos leucócitos, plasma e fezes

O número de moléculas de CPV/ $\mu\text{L}$  nos leucócitos ( $p=0,4066$ ), plasma ( $p=0,5606$ ) e fezes ( $p=0,1706$ ) dos animais com linfoma antes do início da quimioterapia (T0) não diferiu significativamente da quantificação feita nos animais saudáveis (Gráfico 13).

**Gráfico 13:** Número de moléculas de CPV/ $\mu\text{L}$  ( $\log+1$ ) nos leucócitos, plasma e fezes dos animais do grupo oncológico e do grupo controle, em T0



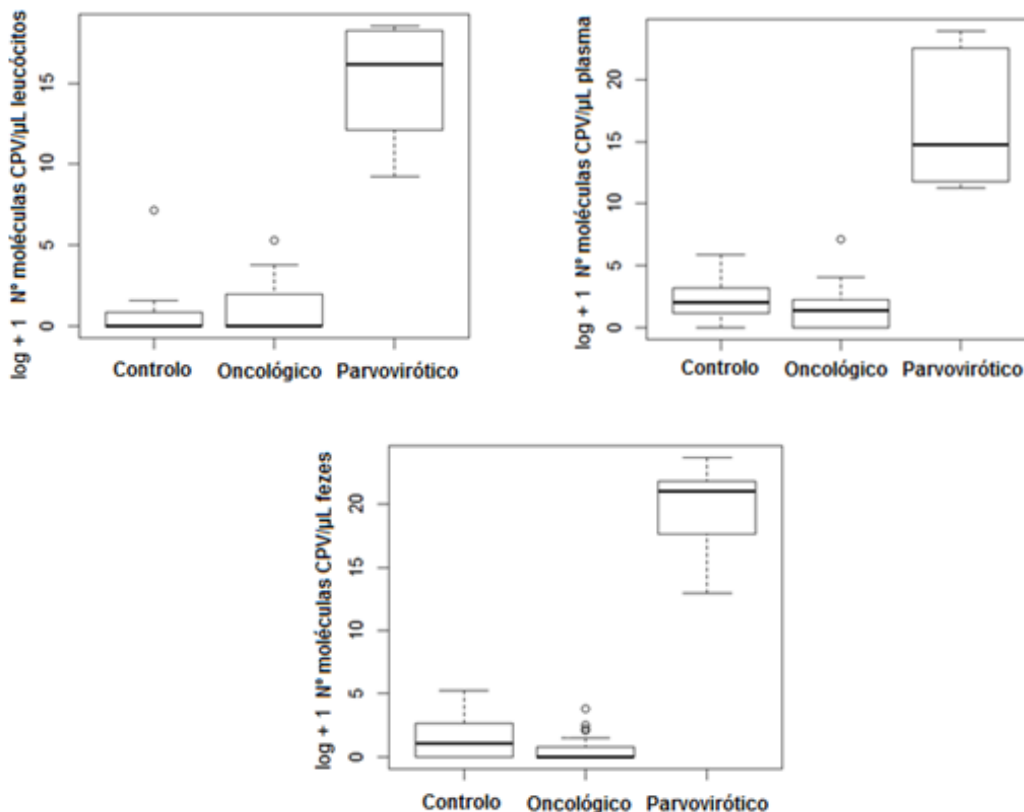
**Gráfico 13:** (Continuação)



### 3.4. Carga viral: grupos oncológico e controlo vs grupo da parvovirose

O grupo de animais com diagnóstico clínico de parvovirose foi incluído neste estudo essencialmente para comparar o seu perfil de positividade com o perfil dos cães dos outros dois grupos. Como se pode verificar pela Tabela 17 (Anexo VI), a carga viral encontrada nos três materiais biológicos estudados é superior nos cães com parvovirose, relativamente aos cães do grupo oncológico e do grupo controlo. De facto, foi observada uma diferença significativa entre grupos no que se refere aos leucócitos ( $p < 0,001$ ), ao plasma ( $p < 0,001$ ) e às fezes ( $p < 0,001$ ) (Gráfico 14), sendo o grupo dos cães com parvovirose o responsável por essa diferença (Tabela 9).

**Gráfico 14:** Comparação do número de moléculas de CPV/μL (log+1) entre grupos, nos leucócitos, no plasma e nas fezes



**Tabela 9:** Resultados do teste Tukey de comparação múltipla

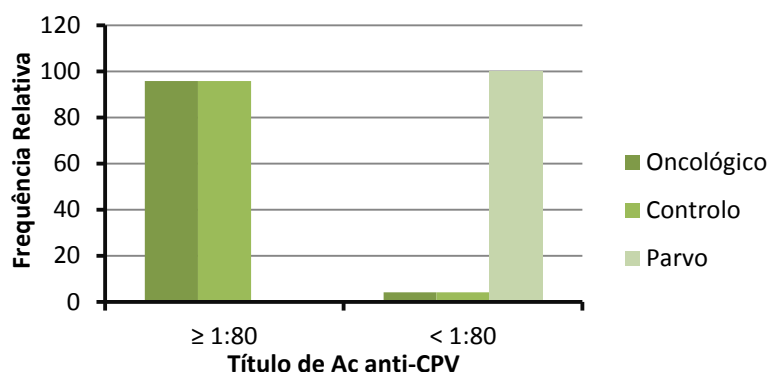
CPV	Leucócitos	Plasma	Fezes
<i>Oncológico-Controlo</i>	p=0.41	p=0.345	p=0.0552
<i>Parvovirose-Controlo</i>	p<0,001*	p<0,001*	p<0.001*
<i>Parvovirose-Oncológico</i>	p<0,001*	p<0,001*	p<0.001*

\* Indica diferenças significativas (p<0,05).

#### 4. Detecção de anticorpos anti-CPV

A detecção de Ac anti-CPV foi realizada em 3 momentos (T0, T2 e T3). Dos animais submetidos a quimioterapia, apenas 1 (12,5%) não manteve o título de Ac protector durante a totalidade do estudo (animal A). O mesmo se verificou no grupo controlo (animal O). Estas ocorrências foram observadas em T2, tendo os Ac recuperado o título protector na colheita seguinte (T3). Todos os animais com parvovirose apresentaram um título de Ac inferior ao título considerado protector (Anexo VII: Tabelas 18 e 19 e Figura 6). Assim, foi observada uma diferença significativa entre grupos, no que respeita ao título de Ac anti-CPV encontrado (p<0,001), estando o grupo de animais com parvovirose associado à ausência de um título de Ac protector (Gráfico 15).

**Gráfico 15:** Título de Ac anti-CPV, nos três grupos estudados



##### 4.1. Influência do linfoma no título de anticorpos anti-CPV

Como referido anteriormente, esta análise foi feita com base na comparação entre os resultados obtidos em T0 para o grupo oncológico e o grupo controlo. Em ambos os grupos, 100% dos animais obtiveram um título de Ac protector, pelo que o linfoma não parece influenciar esta variável.



## V. DISCUSSÃO

Em medicina humana, o sistema imunitário de pacientes oncológicos com neoplasias malignas e submetidos a tratamentos antineoplásicos tem sido muito estudado e, de uma maneira geral, tem sido considerado enfraquecido. Contudo, poucos têm sido os estudos realizados sobre a função imunitária de animais na mesma situação.

A interacção entre o sistema imunitário e a neoplasia é complexa. Se, por um lado, a imunodepressão pode ser responsável pelo desenvolvimento de neoplasias (tal como proposto pelo conceito de vigilância imunitária e fundamentado por observações de uma incidência aumentada de neoplasias malignas em pacientes imunodeprimidos), por outro, os fármacos citotóxicos utilizados no tratamento das referidas neoplasias são muitas vezes imunodepressores. Contudo, para além do tratamento quimioterápico, tem sido demonstrado que a imunodepressão pode resultar da presença da própria neoplasia, principalmente as hematopoiéticas (Rasmussen & Arvin, 1982; Haining et al., 2005; Kovacs et al., 2008). Uma publicação recente atribui parte da responsabilidade pela imunodepressão aos macrófagos activados pela via alternativa (Hao et al., 2012). Estes macrófagos, que parecem colonizar a maioria das neoplasias, expressam uma grande variedade de moléculas anti-inflamatórias que promovem um ambiente imunodepressor e parecem estar envolvidos em vários processos tumorais, incluindo a angiogénese, o crescimento e a capacidade de metastização. Noutro estudo do mesmo ano (Sherger, Kisseberth, London, Olivo-Marston & Papenfuss, 2012) foi avaliada a presença de células CD11b<sup>low</sup>/CADO48<sup>low</sup> no sangue de cães com neoplasias. As células com este fenótipo parecem pertencer ao grupo de células supressoras derivadas da linha mielóide (CSDM), que contribuem de forma significativa para a imunodepressão observada em pacientes oncológicos. Estas células inibem a resposta imunitária inata e adquirida através da alteração dos mecanismos de interacção celular e da produção de mediadores solúveis, como a arginase, o óxido nítrico e produtos de oxigénio reactivo. São portanto capazes de inibir células NK, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T CD4 e T CD8. As CSDM estão tipicamente aumentadas em pacientes oncológicos de várias espécies, pelo que a sua identificação e o desenvolvimento de terapêuticas a elas direccionadas está a ser activamente investigada na oncologia humana e veterinária. Este estudo confirmou o aumento significativo do número de CSDM no sangue periférico de cães com tumores, em comparação com animais saudáveis, bem como a sua capacidade de inibir a proliferação de linfócitos caninos *in vitro*.

Assim, este trabalho teve dois objectivos principais: (1) verificar quais as alterações imunitárias ocorridas em cães submetidos a quimioterapia para uma das mais frequentes neoplasias caninas, o linfoma, usando o CPV como modelo viral; (2) determinar qual o papel do linfoma nas referidas alterações imunitárias.

## 1. Hemograma

A anemia não regenerativa (normocítica e normocrômica) observada em 7 (87,5%) dos cães com linfoma é uma síndrome paraneoplásica comum nestes animais (Vail & Young, 2007; Vail, 2011). Como seria de esperar, o hematócrito dos cães com linfoma ao longo do estudo foi significativamente inferior ao dos animais saudáveis, cujos valores se situaram no intervalo de referência (Gráfico 1).

Cães com linfoma e/ou submetidos a quimioterapia podem, embora pouco frequentemente, apresentar trombocitopenia (Vail, 2011). Neste trabalho, apenas um dos animais com linfoma manifestou trombocitopenia, o que está de acordo com o acima mencionado. Pelo contrário, 4 (50%) animais do grupo oncológico apresentaram trombocitose, o que se pode ter devido quer à administração de prednisolona, incluída no protocolo CHOP, quer a factores de *stress*/excitação sentidos pelos animais. A trombocitose pode ainda ser fisiológica em animais mais velhos (Gough, 2007), sendo que estes animais apresentavam 9, 11, 6 e 8 anos de idade, respectivamente. A trombocitopenia encontrada em 6 animais saudáveis deve-se provavelmente a factores de ordem técnica. A colheita de sangue destes animais não foi realizada no HEFMV-UTL, pelo que as amostras tiveram de ser transportadas em refrigeração, não tendo por isso sido imediatamente processadas (por vezes, só foi possível o processamento no dia seguinte à colheita). O transporte e a demora no processamento aceleraram a deterioração do sangue, razão pela qual algumas amostras apresentaram algum grau de hemólise que pode dificultar a contagem plaquetária. Estes resultados explicam a diferença significativa encontrada no número de plaquetas dos cães com linfoma, quando comparados com os cães saudáveis (Gráfico 3).

Os cães com linfoma podem apresentar neutropenia (especialmente em caso de envolvimento da medula óssea), neutrofilia (em 25-40% dos casos) e linfocitose (em 20% dos casos) (Vail, 2011). Neste estudo, 6 dos cães com linfoma estudados apresentaram leucocitose por neutrofilia, pelo menos uma vez ao longo do estudo, sendo que um deles tinha também linfocitose. O facto de não se ter realizado PAAF de medula óssea dos animais estudados não permite confirmar se os resultados obtidos estão de acordo com o geralmente observado em cães com linfoma. A neutropenia e a linfopenia observadas poderão estar associadas à doença de base e aos efeitos da quimioterapia, sendo que a linfopenia (principalmente em T0, em que ainda não se iniciou a administração de nenhum fármaco citotóxico) pode também ter-se devido ao *stress*/excitação no momento da colheita. A infecção por CPV também poderia resultar nestas alterações, mas os animais em causa não apresentaram quaisquer sinais clínicos indicativos de parvovirose, como febre, prostração, vómito e diarreia. Como se pode perceber pela análise destes resultados, o leucograma dos animais com linfoma sofreu várias oscilações, com animais a apresentarem contagens opostas em diferentes momentos do estudo (ex: o animal D apresentou linfopenia em T1 e linfocitose em T2 e T3).

Finalmente, a monocitose observada pode ter-se devido à presença de glucocorticóides endógenos (em T0, devido a *stress*/excitação) e exógenos (durante a administração de prednisolona) A ausência de alterações no leucograma dos animais saudáveis é responsável pela diferença significativa encontrada no número de leucócitos e de monócitos, entre os dois grupos (Gráficos 2 e 4).

### **1.1. Variação do hemograma dos grupos oncológico e controlo ao longo do tempo**

O hematócrito dos animais do grupo oncológico diferiu significativamente do hematócrito do grupo controlo, sendo inferior em todas as colheitas realizadas (Gráfico 1). A variação significativa do hematócrito dos dois grupos ao longo do tempo resulta, como referido anteriormente, de uma variação significativa deste parâmetro no grupo controlo, uma vez que o hematócrito dos cães com linfoma não variou significativamente ao longo do tempo. Esta variação do hematócrito do grupo controlo não se considera relevante para o presente estudo, já que as colheitas realizadas neste grupo não corresponderam de forma directa às colheitas realizadas no grupo oncológico, onde se pretendia avaliar o efeito do tratamento quimioterápico. Assim, a conclusão mais importante prende-se com o facto de o hematócrito de ambos os grupos ter variado de forma semelhante, o que sugere que a quimioterapia não tem um efeito definitivo sobre esta variável.

A análise do número de monócitos foi semelhante, diferindo apenas pelo facto de o grupo oncológico apresentar uma média de valores superior à do grupo controlo, em todas as colheitas realizadas (Gráfico 2).

As plaquetas e os leucócitos também foram significativamente diferentes entre grupos, apresentando valores superiores nos cães do grupo oncológico. Contudo, não variaram significativamente ao longo do tempo, tendo apresentado nos dois grupos, uma variação semelhante (Gráficos 3 e 4).

Finalmente, os valores de neutrófilos e linfócitos não diferiram significativamente entre grupos nem ao longo do tempo. Tal como nos parâmetros anteriores, não houve uma influência significativa da interacção entre o grupo e o momento de colheita (Gráficos 5 e 6). O facto de não ter existido uma diferença significativa na forma como, para os dois grupos, qualquer dos parâmetros variou ao longo do tempo, sugere que a quimioterapia não parece influenciar o hemograma dos animais com linfoma. Esta conclusão difere de alguns estudos realizados sobre o tema. Em 2002, Winnicka e seus colaboradores verificaram que a quimioterapia para linfoma multicêntrico canino resultou numa diminuição significativa do número de leucócitos e linfócitos B e num aumento das subclasses de linfócitos T. Neste estudo, a quimioterapia originou um retorno dos parâmetros avaliados (que estavam alterados antes do início do tratamento) para valores observados em animais saudáveis. Noutra publicação, animais com linfoma em remissão apresentaram hematócritos e contagens de linfócitos significativamente inferiores, bem como uma diminuição da maioria

das suas subclasses (14 em 20), quando comparados com animais saudáveis (Gauthier et al., 2005). Isto implica que tenha existido uma diminuição generalizada da produção de linfócitos. A diminuição dos linfócitos com fenótipo CD45RA+ (característico de linfócitos imaturos) e o aumento de linfócitos com fenótipo CD90 (que no cão parecem incluir uma maior proporção de linfócitos T maduros) sugere uma redução preferencial de linfócitos imaturos com poupança das células de memória. Assim, os autores concluíram que a quimioterapia é responsável por uma diminuição profunda na maioria das subclasses de linfócitos e por um compromisso da regeneração linfocitária. Contudo, esta diminuição deve ser interpretada com cuidado, uma vez que este estudo foi realizado em cães em remissão, não sendo conhecidos os valores iniciais (antes do início da terapêutica).

A ausência de uma variação significativa do hemograma ao longo do tratamento quimioterápico encontrada no presente estudo está em concordância com um trabalho de 2006, em que a administração isolada de doxorrubicina e a administração do protocolo CHOP não apresentaram um efeito imunodepressor significativo no sentido de induzir uma diminuição sustentada nos números de linfócitos T CD4+ e CD8+ em cães. Apesar de o CHOP ter induzido uma diminuição dos linfócitos B rápida e persistente, nenhum dos protocolos parece ter diminuído significativamente a capacidade dos cães montarem uma resposta humoral a um novo antígeno, sugerindo novamente que os linfócitos B de memória e os plasmócitos possam ser refractários aos efeitos dos protocolos de associação (Walter et al., 2006). No que se refere aos linfócitos T, os resultados obtidos foram considerados surpreendentes face às propriedades imunodepressoras da quimioterapia reportadas (especialmente com protocolos de associação de fármacos). Contudo, os autores não excluem a hipótese de existir uma alteração funcional dos linfócitos T, apesar de a considerarem improvável.

Lima (2011) concluiu que, no que se refere ao hemograma, apenas os valores de leucócitos e eosinófilos poderão ser influenciados pela quimioterapia. No entanto, este estudo utilizou uma amostra heterogénea e de pequenas dimensões, não permitindo a comparação com os resultados aqui apresentados.

Os parâmetros do hemograma analisados variaram de forma diferente ao longo da duração do estudo. Pela observação dos gráficos 1 a 6 verificamos que, no geral, o hematócrito e o número de plaquetas aumentaram, enquanto os leucócitos e suas populações diminuíram.

Contudo, esta análise não fornece informação acerca dos valores obtidos entre a primeira e a última colheita. Neste contexto, verificou-se uma oscilação de todos os parâmetros ao longo do estudo que, não obstante, não se revelaram significativas relativamente aos valores iniciais. Estas oscilações parecem reflectir os efeitos dos vários fármacos utilizados no protocolo CHOP, incluindo os respectivos graus de toxicidade sobre as células de divisão rápida. Importa referir que, pelo facto de alguns dos animais estudados terem necessitado de adiamentos nas sessões programadas ou até da administração de L-asparaginase, as

colheitas efectuadas não tiveram correspondência directa com o fármaco administrado. Isto impossibilita a avaliação dos efeitos individuais dos fármacos utilizados, não sendo este, contudo, um dos objectivos propostos.

### **1.2. Correlação entre os parâmetros do hemograma**

As correlações encontradas entre os parâmetros do hemograma, quer de animais com linfoma, quer de animais saudáveis não representam uma surpresa, pois reflectem a relação entre leucócitos e suas populações (neutrófilos, linfócitos e monócitos). Apesar das oscilações verificadas nestas células ao longo do tempo, a correlação entre elas foi mantida em ambos os grupos. A única diferença entre grupos é a correlação entre leucócitos e linfócitos encontrada nos animais saudáveis e ausente em animais com linfoma. A observação do gráfico 6 permite verificar que os linfócitos dos animais doentes sofreram uma grande variação, que não acompanhou os valores de leucócitos.

Os neutrófilos são a população de leucócitos mais abundante no sangue dos cães, o que explica as fortes correlações encontradas entre estes dois parâmetros, em ambos os grupos.

### **1.3. Influência do linfoma no hemograma**

O desenvolvimento de linfopénia em pacientes oncológicos humanos é clinicamente relevante, sendo que a linfopénia antes do início da quimioterapia tem sido descrita como um factor de prognóstico negativo, no que se refere à resposta à terapêutica. Apesar de normalmente se assumir que cães com neoplasias são imunodeprimidos, os mecanismos responsáveis pela linfopénia nestes pacientes não são conhecidos. Esta alteração pode resultar de: (1) diminuição da produção de linfócitos, conseqüente a uma disfunção tímica; (2) aumento da destruição dos linfócitos periféricos; (3) linfólise como conseqüência de uma produção de cortisol aumentada (Walter et al., 2006).

Com o objectivo de identificar o efeito do linfoma no hemograma, os valores encontrados no grupo oncológico antes do início da quimioterapia (T0) foram comparados com os de animais saudáveis. As plaquetas, leucócitos e suas populações (neutrófilos, linfócitos e monócitos) foram superiores nos cães com linfoma. Estes resultados são semelhantes aos de outro estudo, onde se encontrou um número elevado de leucócitos no sangue periférico de cães com linfoma (Winnicka et al., 2002). No presente trabalho, contudo, as diferenças encontradas entre grupos não foram significativas, pelo que o linfoma, *per se*, não parece influenciar os valores obtidos. Assim, qualquer diferença significativa encontrada nestes parâmetros nas colheitas subsequentes deveria resultar do tratamento administrado. A quimioterapia não parece, no entanto, influenciar significativamente estas variáveis já que, como referido anteriormente todas elas evoluíram de forma semelhante nos dois grupos. Apenas o hematócrito do grupo oncológico foi significativamente inferior ao dos animais

saudáveis. Este resultado está em conformidade com o facto de a anemia não regenerativa ser uma síndrome paraneoplásica típica em casos de linfoma (Vail & Young, 2007; Vail, 2011). Assim, o hematócrito parece ser mais influenciado pela neoplasia de base, do que pelo seu tratamento. Outra alteração que poderia ter sido significativamente diferente entre grupos seria o número de neutrófilos. Também a linfocitose e a trombocitopénia ocorrem em cães com linfoma, embora numa pequena percentagem de casos (Vail, 2011). Contudo, a pequena dimensão da amostra em estudo pode ter ocultado a presença de outras diferenças significativas, para além do hematócrito.

Num dos primeiros estudos realizados sobre a função imunitária em cães com neoplasias malignas, verificou-se uma resposta imunitária (celular e humoral) marcadamente comprometida, bem como uma diminuição da função do SRE em cães com linfoma (Weiden, et al., 1974). No entanto, cães com tumores sólidos apresentaram uma imunidade humoral e função do SRE intactas e uma diminuição parcial da imunidade celular. Em 2002, Winnicka e seus colaboradores encontraram uma contagem de leucócitos e linfócitos B significativamente superiores à de animais saudáveis, mas uma diminuição dos linfócitos T e suas subclasses (CD4+ e CD8+). Walter et al. (2006) encontraram igualmente uma diminuição significativa dos linfócitos e suas subclasses em animais com linfoma ou osteossarcoma, quando comparados com um grupo controlo. A contagem de linfócitos B, pelo contrário, não foi significativamente diferente entre os cães com neoplasias e os cães saudáveis, mas os cães com osteossarcoma apresentaram significativamente menos linfócitos B que os cães com linfoma. Embora com algumas diferenças relativamente à caracterização do sistema imunitários de cães com linfoma, todos estes estudos sugerem que a neoplasia de base pode ser responsável pelo tipo e grau de imunodepressão existentes nestes pacientes. Neste trabalho, tal conclusão apenas se parece verificar em relação ao hematócrito mas é necessário lembrar que a pequena dimensão da amostra pode não ter permitido encontrar a verdadeira expressão dos resultados.

## **2. Detecção de CPV nos leucócitos, plasma e fezes**

Após infecção pela via oronasal, o CPV multiplica-se em células de divisão rápida do tecido linfóide, especialmente linfócitos e monócitos. A destruição destes leucócitos permite a passagem do vírus para a corrente sanguínea (virémia) (Stann, DiGiacomo, Giddens & Evermann, 1984; Meunier, Cooper, Appel, Lanieu & Slauson, 1985a), enquanto a destruição de outras células de divisão rápida, como os enterócitos das criptas de Lieberkühn, possibilita a excreção do vírus nas fezes (Pollock, 1982). Assim, o CPV pode ser detectado em leucócitos (fase celular), no plasma (fase de virémia) e nas fezes (fase de excreção).

O CPV foi identificado em todos os cães de ambos os grupos, em pelo menos um tipo de material biológico e em pelo menos uma colheita. A observação da Tabela 8 permite verificar a existência de oscilações na carga viral encontrada em cada material biológico

analisado ao longo do tempo, sugerindo que não ocorre um aumento ou diminuição progressiva da mesma como consequência do tratamento quimioterápico. Apesar de se ter verificado a presença de CPV nos cães com linfoma, os sinais clínicos por eles apresentados correspondem na maioria dos casos a ligeiras alterações que recuperaram com a administração do tratamento adequado. Além disso, os sinais clínicos em causa são também característicos do efeito tóxico dos fármacos utilizados, nas células da medula óssea e no TGI.

Num estudo anterior verificou-se a presença de CPV nos leucócitos e plasma de 55,5% e 22,2% animais com neoplasias malignas, respectivamente. A presença de CPV nas fezes não foi encontrada em nenhum dos animais (Lima, 2011). No estudo mencionado a presença de CPV foi analisada através de PCR convencional, não tendo sido realizada a sua quantificação. Contudo, os resultados do presente trabalho parecem estar de acordo com o anterior, em que apenas um dos animais analisados apresentou sinais clínicos possivelmente sugestivos de algum grau de imunodepressão. Também no estudo citado, a instituição de tratamento possibilitou a recuperação do estado clínico do animal em causa, não permitindo responsabilizar o CPV pelos sinais mencionados.

### **2.1. Variação da concentração de CPV nos leucócitos, plasma e fezes dos animais dos grupos oncológico e controlo ao longo do tempo**

A carga viral encontrada nos leucócitos dos cães com linfoma não diferiu significativamente daquela encontrada no grupo controlo, apesar de ter sido superior em 3 colheitas (Gráfico 9). Pelo contrário, foi identificada uma diferença significativa entre a carga viral plasmática e fecal do grupo oncológico e a carga viral plasmática e fecal do grupo controlo (Gráficos 10 e 11).

O efeito principal da variável tempo nos dois grupos estudados apenas foi significativo para o plasma e as fezes. No entanto, nos cães com linfoma, a carga viral não variou significativamente ao longo do estudo em nenhum dos três materiais biológicos analisados. Assim, tal como anteriormente mencionado para o hematócrito e os monócitos, a variação significativa encontrada para a carga viral do plasma e fezes nos dois grupos, deve-se a uma variação significativa destas variáveis no grupo controlo.

A análise dos gráficos 9 a 11 permite verificar a existência de um pico de carga viral em T1 no grupo controlo, que está na origem desta variação significativa ao longo do tempo. O pico encontrado na carga viral leucocitária e fecal deve-se a um único animal (animal Q e animal I, respectivamente). Contrariamente, o pico de carga viral plasmática deve-se aos animais M, N, O, P e Q (Anexo VI: Tabela 17). Apesar de todos os animais estudados apresentarem elevado acesso ao exterior, a exposição a possíveis fontes de infecção por CPV foi mais difícil de controlar nos animais do grupo controlo, já que este acesso era permanente em 6

dos 8 animais. Além disso, deve ter-se em conta que a pequena dimensão da amostra pode ter impedido a diluição da influência destes *outliers* nos valores de *p*.

A carga viral leucocitária dos dois grupos não apresentou uma variação significativamente diferente ao longo do tempo, pelo que a quimioterapia não a parece influenciar. Pelo contrário, a carga viral do plasma e das fezes evoluiu de forma diferente nos dois grupos, o que sugere a possibilidade de um efeito do tratamento quimioterápico nestas variáveis, devendo porém ter-se em conta a existência de *outliers* no grupo controlo anteriormente referida.

Tal como no hemograma, também a carga viral nos três materiais biológicos estudados apresentou oscilações ao longo do estudo, embora não significativamente diferentes dos valores iniciais.

A tabela 17 (Anexo VI) mostra que o plasma foi o material onde mais frequentemente foi detectada a presença de CPV quer no grupo oncológico, quer no grupo controlo. De acordo com a dinâmica de infecção por CPV, a presença de virémia pressupõe a replicação do vírus nas células alvo. Contudo, o facto de o *qPCR* utilizado detectar a presença de ADN viral não permite saber se o vírus estava ou não envolvido por Ac neutralizantes, principalmente no que se refere à sua presença no plasma e lúmen intestinal. A localização preferencial do vírus no plasma destes indivíduos (indivíduos portadores) permite teorizar sobre a possibilidade de o CPV, embora activo, ser mantido num estado de equilíbrio através da vigilância do sistema imunitário do hospedeiro, nomeadamente através da acção dos Ac neutralizantes. Estes têm um importante papel na limitação da infecção de outras células, impedindo o desenvolvimento de doença clínica. Contudo, esta hipótese deve ser considerada cuidadosamente, uma vez que a pequena dimensão da amostra não permite conclusões definitivas.

## **2.2. Correlação entre a concentração de CPV nos leucócitos, plasma e fezes**

Nos animais saudáveis foram encontradas correlações moderadas entre a carga viral detectada nos três materiais biológicos estudados (Gráfico 12), o que parece refletir a dinâmica de infecção do CPV. Por exemplo, quando o CPV é detectado no plasma é de esperar que também seja encontrado nos leucócitos, uma vez que a fase plasmática da virémia é consequência da destruição destas células. Da mesma forma, a presença de CPV nas fezes sucede a sua localização nos enterócitos (fase celular), pelo que é expectável a detecção de CPV também nos leucócitos.

Pelo contrário, não foi observada nenhuma correlação entre a detecção do vírus nos três materiais biológicos nos cães com linfoma. Estes resultados sugerem a possibilidade de a quimioterapia ser responsável por uma alteração do equilíbrio observado em animais portadores.

### **2.3. Influência do linfoma na concentração de CPV nos leucócitos, plasma e fezes**

A carga viral leucocitária e plasmática dos cães com linfoma foi superior à detectada nos cães saudáveis. Contrariamente, a carga viral das fezes do grupo oncológico foi inferior à do grupo controlo (Gráfico 13). As diferenças encontradas entre grupos não foram, contudo, significativas, pelo que o linfoma, *per se*, não parece influenciar os valores obtidos.

Tal como o mencionado para o hemograma, qualquer diferença significativa encontrada nestes parâmetros em colheitas subsequentes deveria resultar do tratamento quimioterápico. Esta hipótese poderá ser excluída relativamente à presença de CPV nos leucócitos dada a ausência de variação significativa entre os dois grupos. Já o efeito significativo da interacção entre o grupo e o tempo observado na carga viral plasmática e fecal sugere um possível papel da quimioterapia nestas variáveis, sem esquecer as ressalvas a esta situação mencionadas anteriormente.

### **2.4. Carga viral: grupos oncológico e controlo vs grupo da parvovirose**

A inclusão de animais com diagnóstico clínico de parvovirose pretendeu traçar um perfil de positividade nestes animais e compará-lo com o perfil dos cães do grupo oncológico e do grupo controlo.

No *qPCR*, uma reacção positiva é detectada pela acumulação de fluorescência. O CT (*cycle threshold*) corresponde ao número de ciclos necessários para que essa fluorescência ultrapasse o limiar de detecção. Assim, o CT é inversamente proporcional à quantidade de ácido nucleico alvo na amostra, ou seja, um ácido nucleico com maior concentração será detectado mais precocemente (CT inferior) do que um com baixa concentração, que será detectado mais tardiamente (CT superior) (Anexo VI: Figura 5).

No grupo de animais com parvovirose, o CPV detectado nos leucócitos, plasma e fezes apresentou uma ordem de grandeza significativamente superior à dos outros grupos (oncológico e controlo) (Gráfico 14). Este resultado traduz a diferença entre animais com doença clínica e animais portadores. De facto, nem todos os animais exibem sinais clínicos da doença, existindo infecções subclínicas e animais portadores (Decaro et al., 2005c; Berns & Parrish, 2007) que, embora assintomáticos, podem excretar o vírus nas fezes (Stann, et al., 1984). No presente estudo, todos os animais do grupo oncológico e do grupo controlo podem ser considerados portadores. A excreção esporádica de quantidades residuais de CPV que estes animais apresentam não parece representar perigo de infecção para animais imunodeprimidos, já que os animais com linfoma e submetidos a quimioterapia não evidenciaram sinais clínicos sugestivos de parvovirose.

Crianças com neoplasias excretam vírus influenza por um período de tempo superior ( $\geq 7$  dias) ao de indivíduos imunocompetentes (2-5 dias), o que sugere que possam ser um reservatório da doença para outras crianças hospitalizadas no mesmo local (Täger, Zolezzi, Folatre, Navarrete & Rojas, 2006). Este não parece ser o caso em relação ao CPV, pois a

carga viral presente nas fezes dos cães com linfoma foi inferior à dos cães saudáveis (Gráfico 14). Contudo, nunca é demais lembrar que se trabalhou com uma amostra pequena.

A detecção de quantidades residuais de CPV nos leucócitos, plasma e fezes dos cães com linfoma e dos cães saudáveis resulta da elevada sensibilidade do *qPCR* (Decaro et al., 2005a), não representando risco biológico para os animais. A sensibilidade superior do *qPCR* relativamente ao PCR convencional também pode explicar o facto de, num trabalho anterior (Lima, 2011), não ter sido observada excreção do vírus em nenhum animal.

### **3. Detecção de anticorpos anti-CPV e influência do linfoma no respectivo título**

No Homem, os estudos feitos até à data suportam a hipótese de que os agentes quimioterápicos diminuem os títulos de Ac contra vírus comuns (Alanko et al., 1992; Nilsson et al., 2002; Reinhardt et al., 2003; Torben et al., 2004; Zignol et al., 2004), mas o significado clínico destes resultados em pacientes oncológicos veterinários é ainda pouco conhecido.

Em 2001, Henry e seus colaboradores verificaram uma diminuição do título de Ac anti-CPV em 14%, uma manutenção em 52% e um aumento em 33% dos animais submetidos a quimioterapia para várias neoplasias. Em animais com linfoma, os mesmos autores verificaram uma diminuição na percentagem de animais com título protector de Ac anti-CPV no final do tratamento. Mais recentemente, verificou-se que o título de Ac contra o CPV diminuiu em 11% dos animais, tendo-se mantido em 33% e aumentado em 56% dos casos (Lima, 2001). Contudo, a técnica utilizada neste estudo não permitiu a detecção de Ac protectores.

A prova *gold standard* para a detecção de Ac anti-CPV é IH. Esta prova baseia-se na capacidade que o CPV tem de aglutinar eritrócitos de suíno, fornecendo indicação sobre a presença de Ac plasmáticos específicos anti-CPV. Estes são Ac neutralizantes que se ligam ao vírus para impedir a infecção de novas células, facilitar a destruição pelo sistema imunitário e neste contexto, inibir a capacidade hemaglutinante do vírus. O ELISA tradicional não garante a detecção exclusiva de Ac protectores, incluindo Ac sinalizadores e moduladores da resposta imunitária que, apesar de serem igualmente específicos para o CPV, não actuam directamente sobre ele. Apesar das evidentes vantagens, a IH é uma técnica morosa e com maior grau de dificuldade técnica, pelo que não foi possível, em tempo útil, utilizá-la neste trabalho. Assim, optou-se pela realização de uma prova de ELISA semi-quantitativa (TiterCHEK<sup>®</sup> CDV/CPV), cujos resultados apresentam correspondência com a prova de IH (Litster, Pressler, Volpe & Dubovi, 2012). Contudo, o *kit* utilizado não permite avaliar a variação do título de Ac anti-CPV, pelo que não foi possível compará-la com os estudos anteriores.

Antes de iniciarem o tratamento, todos os animais do grupo oncológico apresentavam títulos de Ac anti-CPV superior ao nível protector ( $\geq 1:80$ ), pelo que o linfoma *per se* não parece

influenciar esta variável. Ao longo do tratamento apenas um dos animais submetidos a quimioterapia (animal A) e um dos animais saudáveis (animal O) não mantiveram o título de Ac protector (Anexo VII: Tabela 18). Ambas as diminuições ocorreram em T2, tendo os Ac recuperado o título protector em T3. Estes resultados sugerem a ocorrência de alguma variação dos títulos de Ac durante os tratamentos antineoplásicos já descrita noutros estudos, embora sem diferenças significativas entre o grupo submetido a quimioterapia e o grupo de animais saudáveis. Poder-se-ia pensar que em T2 os animais com título <1:80 estariam em perigo de desenvolver parvovirose. Contudo, apesar de ter sido detectado CPV no plasma e fezes do animal A e no plasma do animal O, nenhum dos dois apresentou sinais clínicos ou laboratoriais indicativos de parvovirose nos momentos em questão. Não só as diminuições observadas foram temporárias, como um título de Ac diminuído ou ausente num cão vacinado ou previamente exposto não significa necessariamente que está em perigo. Os vários componentes do sistema imunitário funcionam de forma integrada e interdependente, devendo ter-se em conta a presença de outras linhas de defesa quer inatas, quer adquiridas. De facto, a imunidade celular é muito importante na defesa do organismo contra vírus, não devendo o significado da diminuição dos Ac abaixo do título protector ser sobrestimado (Reinhardt et al., 2003). O facto de o título de Ac ter atingido níveis protectores na última colheita, sem que nenhum dos animais tenha sido vacinado durante o estudo, sugere a possibilidade de estes animais terem contactado com o vírus, tendo, no entanto, mantido a capacidade de responder a esse contacto com uma resposta imunitária secundária. Embora com algumas diferenças temporais, todos os animais do grupo oncológico e do grupo controlo estavam devidamente vacinados contra a parvovirose, o que implica o estabelecimento de uma resposta imunitária primária contra o CPV, com manutenção de células de memória, precursoras das IgG detectadas. No grupo de animais com diagnóstico clínico de parvovirose, nenhum dos indivíduos estava vacinado. Como seria de esperar, todos eles apresentaram um título de Ac inferior ao título considerado protector (Anexo VII: Tabela 18), o que se deve ao facto de a prova de ELISA utilizada detectar IgG's, características de uma resposta imunitária secundária.

Os resultados obtidos estão de acordo com a maioria dos estudos realizados em cães (Henry et al., 2001; Walter et al., 2006; Lima, 2011) em que se verificam variações no título de Ac anti-CPV como consequência da administração de fármacos citotóxicos, mas em que a imunidade previamente adquirida através de vacinação ou exposição natural não parece ser significativamente comprometida pelo referido tratamento, sendo igualmente mantida a capacidade de montar uma resposta humoral a uma exposição ou revacinação. Relativamente ao papel do linfoma na manutenção dos títulos de Ac anti-CPV, os presentes resultados são contrários aos encontrados por Weiden et al (1974), onde a resposta humoral e os títulos de IgG de cães com linfoma eram significativamente inferiores aos de animais saudáveis. Contudo, estudos mais recentes e com delineamento experimental mais próximo

do que aqui se expõe suportam a teoria de que o linfoma não parece ter influência neste parâmetro dada a ausência de diferenças significativas entre os títulos iniciais de animais com linfoma e os títulos de animais saudáveis (Henry et al., 2001; Lima, 2011).

#### **4. Considerações finais e perspectivas futuras**

O tratamento do linfoma resulta frequentemente em linfopénia, embora não se saiba se esta alteração se deve a uma redução generalizada dos linfócitos, ou a uma diminuição específica por alteração do perfil de linfócitos circulantes. No delineamento experimental deste trabalho, não foi possível incluir a avaliação do número de linfócitos B, linfócitos T e respectivas subclasses, pelo que as únicas indicações obtidas acerca da imunidade adquirida foram o número de linfócitos (avaliado através do hemograma) e a seroconversão. O protocolo CHOP é também conhecido por induzir neutropénia, deprimindo assim a imunidade fagocitária inata.

Esquemáticamente, os resultados obtidos neste estudo sugerem que, dos parâmetros analisados, apenas o hematócrito parece ser influenciado mais pelo linfoma do que pelo protocolo quimioterápico CHOP. Pelo contrário, o linfoma não parece ter influência na carga viral presente no plasma e fezes dos animais, que apenas parecem ter sido influenciados pela quimioterapia. Finalmente, o número de plaquetas, leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos, bem como a carga viral leucocitária e o título de Ac anti-CPV não parecem ser influenciados nem pelo linfoma de base, nem pelo seu tratamento.

O facto de não se ter observado uma alteração significativa do número de leucócitos e suas populações como consequência da quimioterapia pode resultar do cronograma adoptado. As colheitas foram realizadas imediatamente antes de cada sessão, momento em que a maioria dos valores podia já ter recuperado. De facto, os protocolos de associação de fármacos são normalmente desenhados de forma a permitir a recuperação da medula óssea (Lana & Dobson, 2011).

Assim, e contrariamente ao que se poderia pensar, não foram observadas evidências de uma diminuição da resposta imunitária quer no momento de admissão, quer após dois ciclos de quimioterapia. Embora as respostas imunitárias após vacinação não tenham sido avaliadas neste estudo, os dados obtidos sugerem que a imunidade estabelecida através de vacinação prévia (pelo menos no que refere ao CPV) não é significativamente comprometida com o protocolo estudado. Seria então importante o seguimento dos animais a longo prazo (pelo menos até ao final do protocolo), associado à avaliação da resposta imunitária pós-vacinal de forma a confirmar o referido anteriormente e permitir o delineamento de protocolos vacinais adequados a estes pacientes. Contudo, não só limitações de ordem temporal e orçamental impossibilitaram o seguimento dos animais para além dos dois meses de tratamento, como a elevada mortalidade associada a este tipo de neoplasias

tornariam difícil esse seguimento e avaliação da resposta vacinal pós-quimioterapia (neste estudo, apenas metade dos animais completaram o protocolo CHOP).

A controvérsia presente nos estudos realizados em cães com neoplasias malignas até à data é reforçada pelo presente trabalho. Isto é, a análise dos resultados obtidos corrobora os achados de uns e contraria os achados de outros (na comparação com alguns estudos mencionados é até possível encontrar resultados semelhantes e resultados contrários, dependendo da situação e parâmetro analisados). De uma maneira geral, os resultados obtidos reforçam a ideia de que, ao contrário do que se passa em medicina humana, não é claro que a imunodepressão seja uma consequência directa de neoplasias hematopoiéticas e/ou seus tratamentos em cães. Assim, esta temática continuará a beneficiar de maior investigação.

Embora se tenham verificado, em algumas colheitas, aumentos na concentração de CPV nos três materiais biológicos estudados (leucócitos, plasma e fezes), estes fizeram parte de um quadro de oscilações e não de um aumento progressivo e sustentado. Nos animais saudáveis, a carga viral presente nos leucócitos variou da mesma forma. Apesar de o mesmo não se ter verificado em relação à carga viral plasmática e fecal, importa lembrar o papel dos *outliers* e da pequena dimensão da amostra nesta situação. Assim, esta diferença não deve ser sobrestimada, pelo que o perfil de localização e carga do CPV nos animais submetidos a quimioterapia pode ser considerado semelhante ao dos animais saudáveis. Além disso, como exposto anteriormente, trata-se de quantificações ínfimas (comparativamente a animais com doença clínica) e aparentemente aleatórias, sem risco biológico para os animais em causa. Esta conclusão é reforçada pelo facto de o título de Ac anti-CPV se ter mantido acima do nível protector em 87,5% dos animais durante a totalidade do estudo quer no grupo de animais submetidos ao protocolo CHOP, quer no grupo de animais saudáveis. Neste contexto, apesar de ter sido utilizada uma prova de ELISA com correspondência com a IH, a titulação dos Ac encontrados ter-se-ia revelado informativa pela possibilidade de avaliar o tipo de variação existente ao longo do tratamento. Os sinais clínicos e laboratoriais apresentados por alguns animais, que poderiam ser da responsabilidade do CPV, são provavelmente causados pelos efeitos tóxicos dos fármacos citotóxicos (mielodepressão e toxicidade GI), já que foram controlados e revertidos pela administração de tratamento adequado. O vômito e inapetência apresentados pelo animal E podem também ter-se devido ao envolvimento intestinal pelo próprio linfoma.

A pequena dimensão da amostra estudada sugere que estes resultados deveriam ser confirmados num estudo mais extenso. Como referido anteriormente, seria também vantajoso determinar o efeito do linfoma e respectivo tratamento na imunidade celular, através da avaliação do número de linfócitos B, linfócitos T e suas subclasses (ex: CD4 e CD8). Além disso, considerando a diferença evidente entre número e função, seria importante estudar outros aspectos da função imunitária, incluindo a determinação directa

das respostas celulares (como a função das células NK ou a produção de IL-2) e inatas (como a função de neutrófilos e monócitos) durante a quimioterapia.

Numa perspectiva epidemiológica, a caracterização do CPV encontrado nestes animais permitiria ainda perceber se se tratava da estirpe vacinal (CPV-2) ou de estirpes selvagens (CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c).

A utilização do CPV como modelo viral neste trabalho deveu-se à elevada prevalência e facilidade de detecção/monitorização. De facto, os animais incluídos neste estudo tiveram a possibilidade de contactar com o vírus quer no seu *habitat*, quer durante as suas visitas ao hospital. Este trabalho pode servir de base para o estudo, a nível nacional ou internacional, de outros vírus potencialmente mais perigosos e/ou clinicamente mais relevantes, como o herpesvírus canino, o vírus da esgana e o vírus da raiva.

Finalmente, o linfoma foi escolhido para este estudo pelo facto de ser uma neoplasia hematopoiética linfoproliferativa, com elevada incidência e potencial imunodepressor. A avaliação do sistema imunitário em cães com outros tipos de neoplasia também se poderá revelar informativa, particularmente no caso de neoplasias como o mieloma múltiplo ou o mastocitoma, produtoras de substâncias imunomodadoras.

## **VI. CONCLUSÃO**

A informação retirada de medicina humana, associada a uma crescente utilização e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas em pacientes oncológicos veterinários, torna imperativo um melhor conhecimento do impacto da quimioterapia nas respostas humorais e celulares.

Contrariamente ao que se poderia pensar, não houve evidência de uma diminuição da resposta imunitária em animais com linfoma e/ou submetidos ao protocolo de associação de fármacos CHOP quer no momento de admissão, quer após dois ciclos de quimioterapia. Adicionalmente, os resultados obtidos indicam que a imunidade previamente estabelecida através de vacinação contra o CPV não foi significativamente comprometida, tendo os animais mantido os títulos de Ac vacinais capazes de responder a uma possível exposição natural. Assim, embora não tenham sido realizados estudos directos de resposta humoral através da vacinação dos animais, estes resultados sugerem que a administração de quimioterapia não impede a administração de vacinas. Isto é particularmente relevante se considerarmos o papel das vacinas anti-tumorais como terapêutica adjuvante da quimioterapia.

Embora o CPV tenha sido detectado nos leucócitos, plasma e fezes de todos os animais, pelo menos uma vez ao longo do período de colheitas, não se verificou um aumento ou diminuição progressiva que fizesse considerar um efeito directo e definitivo do tratamento quimioterápico. Além disso, o perfil de localização e carga do CPV nos animais submetidos a quimioterapia foi considerado semelhante ao dos animais saudáveis. Assim se depreende que o protocolo estudado não parece representar perigo de reactivação de parvovirose, reforçado pelas detecções residuais encontradas nos grupos oncológico e controlo contrastantes com as elevadas quantificações nos cães com infecção por CPV.

De uma maneira geral, e aliado à pequena quantidade de casos reportados de infecções oportunistas em pacientes oncológicos veterinários, fica então reforçada a ideia de que a imunodepressão como consequência de neoplasias hematopoiéticas e seus tratamentos em cães não deve ser considerada uma realidade definitiva, sendo necessária mais investigação sobre o tema.



## VII. BIBLIOGRAFIA

- Alanko, S., Pelhiemi T., Salmi, T. T. (1992). Recovery of blood B-lymphocytes and serum immunoglobulins after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 69(6), 1481-1486
- Alenza, M. D. P., Peña, L., Castillo, N., Nieto, A. (2000). Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract*. 41, 287-291
- Altman, A. (2001). Acute tumor lysis syndrome. *Semin Oncol*. 28(5), 3-8
- American Cancer Society (2011). *The history of cancer*. Acedido em Jun 21, 2012, disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002048-pdf.pdf>
- Ammersbach, M. A. G., Kruth, S. A., Sears, W., Bienzle, D. (2006). The effect of glucocorticoids on canine lymphocyte marker expression and apoptosis. *J Vet Intern Med*. 20, 1166-1171
- Appelbaum, F. R., Sale, G. E., Storb, R., Charrier, K., Deeg, H. J., Graham, T., Wulff, J. C. (1984). Phenotyping of canine lymphoma with monoclonal antibodies directed at cell surface antigens: classification, morphology, clinical presentation and response to chemotherapy. *Hematol Oncol*. 2, 151-168 [abstract] [versão electrónica] Acedido em Set. 27, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Phenotyping%20of%20canine%20lymphoma%20with%20monoclonal%20antibodies%20directed%20at%20cell%20surface%20antigens%3A%20classification%2C%20morphology%2C%20clinical%20presentation%20and%20response%20to%20chemotherapy>
- Argyle, D. J., Khanna, C. (2007). Tumor Biology and Metastasis. In: Withrow, S. J., MacEwen, E. G. (Ed.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (4th ed). (pp. 31-53). St Louis, Missouri: Saunders Elsevier
- Avery, P. R., Avery, A. C. (2004). Molecular methods to distinguish reactive and neoplastic lymphocyte expansions and their importance in transitional neoplastic states. *Vet Clin Pathol*. 33,196-207
- Battilani, M., Bassani, M., Forti, D., Moranti, L. (2006). Analysis of the evolution of feline parvovirus (FPV). *Vet. Res. Commun*. 30, 223-226
- Bergman, P. J. (2010). Cancer immunotherapy. *Vet Clin Small Anim*. 40, 507-518
- Berns, K., Parrish, C. R. (2007). Parvoviridae. In: Knipe, D. M., Howley, P. M. (Eds.), *Fields Virology*. (5th ed.). (pp. 2437–2477). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Binn, L.N., Lazar, E.C., Eddy, G.A. & Kajima, M. (1970). Recovery and characterization of a Minute Virus of Canines. *Infect Immun*. 1, 503-508
- Blackwood, L., German, A. J., Stell, A. J., O'Neill, T. (2004). Multicentric lymphoma in a dog after cyclosporine therapy. *J Small Anim Pract*. 45, 259-262
- Borella, L., Webster, R. G. (1971). The immunosuppressive effects of long-term combination chemotherapy in children with acute leukemia in remission. *Cancer Res*. 31, 420-426
- Bronden, L. B., Rutteman, G. R., Flagstad, A. Teske, E. (2003). Study of dog and cat owners' perceptions of medical treatment for cancer. *Vet Rec*. 152(3), 77-80

- Campo, E., Swerdlow, S. H., Harris, N. L., Pileri, S., Stein, H., Jaffe, E. S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. doi:10.1182, 1-38 [versão electrónica] Acedido em Fev. 12, 2013, disponível em: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/early/2011/02/07/blood-2011-01-293050.full.pdf>
- Carr-Smith, S., Macintire, D. K., Swango, L. J. (1997). Canine parvovirus: part 1. Pathogenesis and vaccination. *Comp Cont Ed Pract Vet*. 19 (2), 125-133 [versão electrónica] Acedido em Set. 27, 2012, disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/23747913/CANINE-Canine-Parvovirus-part-1-Pathogenesis-and-Vaccination>
- Cavalli, A., Martella, V., Desario, C., Camero, M., Bellacicco, A. L., De Palo, P., Decaro, N., Elia, G., Buonavoglia, C. (2008). Evaluation of the antigenic relationships among canine parvovirus type 2 variants. *Clin Vaccine Immunol*. 15, 534-539
- Cerón, H. G. (2009). Bios: Ciclo celular. Acedido em Set. 23, 2012, disponível em: <http://benitobios.blogspot.pt/2009/05/ciclo-celular.html>
- Charney, S. C., Bergman, P. J., Hohenhaus, A. E., McKnight, J. A. (2003). Risk factors for sterile hemomagic cystitis in dogs with lymphoma receiving cyclophosphamide with or without concurrent administration of furosemide: 216 cases (1990-1996). *J Am Vet Med Assoc*. 222, 1388-1393
- Chun, R., Garret, L. D., Vail, D. M. (2000). Evaluation of a high-dose chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J Vet Inter Med*. 14, 120-124 [abstract] [versão electrónica] Acedido em Set. 27, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Evaluation%20of%20a%20high-dose%20chemotherapy%20protocol%20with%20no%20maintenance%20therapy%20for%20dogs%20with%20lymphoma>
- Chun, R., Garrett, L. D., Vail, D. M. (2007). Cancer chemotherapy. In: Withrow, S. J., MacEwen, E. G. (Ed.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (4th ed). (pp. 163-192). St Louis, Missouri: Saunders Elsevier
- Chun, R. (2009). Lymphoma: which chemotherapy protocol and why? *Topics in Companion Animal Medicine*. 24(3),157-62
- Cowell, R. L., Dorsey, K. E., Meinkoth, J. H. (2003). Lymph node cytology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 33, 47-67
- Coyne, M. J., Burr, J. H. H., Yule, t. D., Harding M. J., Tresnan, D. B., McGavin, D. (2001). Duration of immunity in dogs after vaccination or naturally acquired infection. *Vet Rec*. 149, 509-515
- Crysandt, M., Lemmen, S. W., Jost, E., Brummendorf, T. H., Osieka, R., Wilop, S. (2010). Antineoplastic chemotherapy in cancer patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Onkologie*. 33, 598-603
- Day, M. J. (2007). Immune system development in the dog and cat. *J Comp Pathol*. 137: S10-S15
- Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Desario, C., Campolo, M., Di Trani, L., Tarsitano, E., Tempesta, M., Buonavoglia, C. (2005a). A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet Microbiol*. 105, 19-28

- Decaro, N., Desario, C., Campolo, M., Elia, G., Martella, V., Ricci, D., Lorusso, E., Buonavoglia, C. (2005b). Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J Vet Diagn Invest.* 17, 133-138
- Decaro, N., Campolo, M., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., Buonavoglia, C. (2005c). Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals.* 33, 261-267
- Decaro, N., Elia, G., Desario, C., Roperto, S., Martella, V., Campolo, M., Lorusso, A., Cavalli, A., Buonavoglia, C. (2006a). A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus. *J Virol Methods.* 136, 65-70
- Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Campolo, M., Desario, C., Camero, M., Cirone, F., Lorusso, E., Lucente, M. S., Narcisi, D., Scalia, P., Buonavoglia, C. (2006b). Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using a minor groove binder probe technology. *J Virol Methods.* 133, 92-99
- Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Mari, V., Lavazza, A., Nardi, M., Buonavoglia, C. (2008). Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiol.* 31, 125-130
- Decaro, N., Buonavoglia, D., Desario, C., Amorisco, F., Colaianni, M. L., Parisi, A., Terio, V., Elia, G., Lucente, M. S., Cavalli, A., Martella, V., Buonavoglia, C. (2010). Characterization of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia. *Res Vet Sci.* 89, 275-278
- Decaro, N., Desario, C., Amorisco, F., Losurdo, M., Colaianni, M. L., Greco, M. F., Buonavoglia, C. (2011). Canine parvovirus type 2c infection in a kitten associated with intracranial abscess and convulsions. *J Feline Med Surg.* 13, 231-236
- Decaro, N., & Buonavoglia, C. (2012). Canine parvovirus – A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol.* 155, 1-12
- 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? *J Virol Methods.* 146, 202-208
- Dobson, J. M. (2011). Introduction: cancer in cats and dogs. In: Dobson, J. M., Duncan, B., Lascelles, X. (Ed), *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology.* (3rd ed). (pp. 1-5). British Small Animal Veterinary Association
- Edwards, D. S., Henley, W. E., Harding, E. F., Dobson, J. M., Wood, J. L. (2003). Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. *Vet Comp Oncol.* 1, 200-206
- Ettinger, S. N. (2003). Principles of treatment for canine lymphoma. *Clin Tech Small Anim Pract.* 18(2), 92-97
- Fan, T. M. (2003). Lymphoma updates. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 33, 455-471
- Feldman, S., Hughes, W. T., Daniel, C. B. (1975). Varicella in children with cancer: seventy-seven cases. *Pediatrics.* 56(3), 388-397
- Garabrant, D. H., Phillbert, M. A. (2002). Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) epidemiology and toxicology. *Crit Rev Toxicol.* 32(4), 233-257

- Garret, L. D., Thamm, D. H., Chun, R., Dudley, R., Vail, D. M. (2002). Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med.* 16, 704-709
- Gauthier, M. J., Aubert, I., Abrahms-Ogg, A., Woods, J. P., Bienzle, D. (2005). The immunophenotype of peripheral blood lymphocytes in clinical healthy dogs and dogs with lymphoma in remission. *J Vet Intern Med.* 19, 193-199
- Gelain, M. E., Comazzi, S. (2011). Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *Vet J.* 188, 149-155
- Goddard, A. & Leisewitz, A.L. (2010). Canine parvovirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract,* 40(6), 1041-53
- Goldberg, J. D., Kamboj, M., Ford, R., Kiehn, T. E., Gilhuley, K., Perales, M. (2009). 'Kennel cough' in a patient following allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant.* 44, 381-382
- Gopalan, V., Nair, R. G., Pillai, S., Oberholzer, T. (2012). Genital herpes zoster as a consequence of cancer chemotherapy-induced immunosuppression: report of a case. *J Infect Chemother.* [Epub ahead of print]
- Gough, A. (2007). *Differential Diagnosis in Small Animal Medicine.* Oxford, UK: Blackwell Publishing
- Greene, C. E., Decaro, N., (2012). Canine Viral Enteritis. In: Greene, C. E. (ed), *Infectious diseases of the dog and cat.* 4th ed. pp. 67-80. St Louis, Missouri: Saunders Elsevier
- Greenwood, N.M., Chalmers, S. K., Baxendale, W., Thompson, H.(1995) Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis and vaccine efficacy against field strains. *Vet. Rec.* 136, 63-67. [abstract] [versão electrónica] Acedido em Set. 27, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Comparison%20of%20isolates%20of%20canine%20parvovirus%20by%20restriction%20enzyme%20analysis%20and%20vaccine%20efficacy%20against%20field%20strains>
- Haining, W. N., Neuberg, D. S., Kecskemethy, H. L., Evans, J. W., Rivoli, S., Gelman, R., Rosenblatt, H. M., Shearer, W. T., Guenaga, J., Douek, D. C., Silverman, L. B., Sallan, S. E., Guinan, E. C., Nadler, L. M. (2005). Antigen-specific T-cell memory is preserved in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *Blood.*106(5), 1749-1754
- Hao, N., Lü, M., Fan, Y., Cao, Y., Zhang, Z., Yang, S. (2012). Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol.* 2012, 1-11
- Hektoen, L., Corper, H. J. (1921). The effect of mustard gas (dichlorethylsulphid) on antibody formation. *J Infect Diseases.* 28(3), 279-285
- Henry, C. J., McCaw, D. L., Brock, K. V., Stoker, A. M., Tyler, J. W., Tate, S. J., Higginbotham, M. L. (2001). Association between cancer chemotherapy and canine distemper virus, canine parvovirus, and rabies virus antibody titers in tumor-bearing dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 219(9), 1238-1241
- Hoofnagle, J. H. (2009). Reactivation of hepatitis B. *Hepatology.* 49(5), Suppl., 156-165

- Hosoya, K., Kisseberth, W. C., Lord, L. K., Alvarez, F. J., Lara-Garcia, A., Kosarek, C. E., London, C. A., Couto, C. G. (2007). Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma. *J Vet Intern Med.* 21, 1355-1363
- Houston, D. M., Rible, C. S., Head, L. L., (1996). Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). *J Am Vet Med Assoc.* 208: 542-548. [abstract] [versão eletrónica] Acedido em Set. 27, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Risk%20factors%20associated%20with%20parvovirus%20enteritis%20in%20dogs%3A%20283%20cases%20%281982-1991%29>
- Institute for Statistics and Mathematics of the WU Wien (2012). *The R project for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna: Austria. Acedido a 1 de Dezembro, 2012, disponível em: <http://www.R-project.org/>
- Institut Jules Bordet (2005). *The History of Cancer*. Acedido em Jun 21, 2012, disponível em: [http://www.bordet.be/en/presentation/history/cancer\\_e/cancer1.htm](http://www.bordet.be/en/presentation/history/cancer_e/cancer1.htm)
- Jeffreys, A. B., Knapp, D. W., Carlton, W.W., Thomas, R. M., Bonney, P. L., Degortari, A., Lucroy, M. D. (2005). Influence of asparaginase on a combination chemotherapy protocol for canine multicentric lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc.* 41, 221-226
- Keller, E. T. (1992). Immune-mediated disease as a risk factor for canine lymphoma. *Cancer.* 70, 2334-2337
- Komada, Y., Zhang, S., Zhou, Y., Hanada, M., Shibata, T., Azuma, E., Sakurai, M. (1992). Cellular immunosuppression in children with acute lymphoblastic leukemia: effect of consolidation chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 35, 271-276
- 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. *Pathol Oncol Res.* 14, 391-397
- Kubota, Y., Ohji, H., Itoh, K., Sasagawa, I., Nakada, T. (2011). Changes in cellular immunity during chemotherapy for testicular cancer. *Int J Urol.* 8, 604-608
- Lana, S. E., Dobson, J. M. (2011). Principles of chemotherapy. In: Dobson, J. M., Duncan, B., Lascelles, X. (Ed), *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*. (3rd ed). (pp. 60-79). British Small Animal Veterinary Association
- Larson, L. J., Schultz, R. D. (2008). Do two current canine parvovirus type 2 and 2b vaccines provide protection against the new type 2c variant? *Vet Ther.* 9(2), 94-101
- Lima, F. O. N. (2011). Contribuição para o estudo da imunodepressão associada à quimioterapia, em cães. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa
- Litster, A. L., Pressler, B., Volpe, A., Dubovi, E. 2012. Accuracy of a point-of-care ELISA test kit for predicting the presence of protective canine parvovirus and canine distemper virus antibody concentrations in dogs. *Vet. J.* 193(2), 363-366
- Lucroy, M. D., Hill, F. I., Moore, P. F., Madewell, B. R. (1998). Cutaneous papillomatosis in a dog with malignant lymphoma following long-term chemotherapy. *J Vet Diagn Invest.* 10, 369-371
- Lydyard, P. M., Whelan, A., & Fanger, M. W. (2000). *Instant Notes in Immunology*. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd.

- Lymphoma association (2011). *Understanding the classification of non-Hodgkin lymphomas*. Acedido em Fev 11, 2013, disponível em: <http://www.lymphomas.org.uk/sites/default/files/pdfs/Understanding%20the%20classification%20of%20non-Hodgkin%20lymphomas.pdf>
- MacDonald, V. S., Thamm, D. H., Kurzman, I. D., Turek, M. M., Vail, D. M. (2005). Does L-asparaginase influence efficacy or toxicity when added to a standard CHOP protocol for dogs with lymphoma? *J Vet Intern Med.* 19, 732-736
- MacEwen, E.G. (1999). Highlights and horizons in veterinary oncology. *Small Animal/Exotics Compendium*. Acedido em Jun 21, 2012, disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/23752677/Veterinary-Oncology>
- 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. *Oncologist.* 4, 370-378
- Male, D. & Roitt, I. (1996). Introduction to the immune system. In Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (Ed.), *Immunology*. (4th ed). (pp. 1.1-1.12). Barcelona, Spain: Mosby
- Marconato, L., Bonfanti, U., Stefanello, D., Lorenzo, M. R., Romanelli, G., Comazzi, S., Zini, E. (2008). Cytosine arabinoside in addition to VCAA-based protocols for the treatment of canine lymphoma with bone marrow involvement: does it make the difference? *Vet Comp Oncol.* 6, 80-89
- Marconato, L., Gelain, M. E., Comazzi, S., (2013). The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematol Oncol.* 31(1), 1-9
- Martella, V., Cavalli, A., Decaro, N., Elia, G., Desario, C., Campolo, M., Bozzo, G., Tarsitano, E., Buonavoglia, C., (2005). Immunogenicity of an intranasally administered modified live canine parvovirus type 2b vaccine in pups with maternally derived antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12, 1243-1245
- Meunier, P. C., Cooper, B. J., Appel, M. J. G., Lanier, M. E., Saluson, D. O. (1985a). Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: sequential virus distribution and passive immunization studies. *Vet Pathol.* 22, 617-624
- Meunier, P. C., Cooper, B. J., Appel, M. J. G., Saluson, D. O. (1985b). Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia. *Vet Pathol.* 22, 60-71
- Modiano, J. F., Breen, M., Burnett, R. C., Parker, H. G., Inusah, S., Thomas, R., Avery, P. R., Lindblad-Toh, K., Ostrander, E. A., Cutter, G. C., Avery, A. C. (2005). Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. *Cancer Res.* 65, 5654-5661
- Modiano, J. F., Breen, M. (2007). Genetic factors. In: Withrow, S. J., MacEwen, E. G. (Ed.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (4th ed). (pp. 1-12). St Louis, Missouri: Saunders Elsevier
- Moritz, B., Eder, J., Meister, B., Heitger, A. (2001). Intact T-cell regenerative capacity in childhood acute lymphoblastic leukemia after remission induction therapy. *Med Pediatr Oncol.* 36, 283-289

- Nash, T. (1996). Immunity to viruses. In Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (Ed.), *Immunology*. (4th ed). (pp. 16.1-16.8). Barcelona, Spain: Mosby
- Nasir, L., Argyle, D. J. (1999). Mutational analysis of the tumour suppressor gene p53 in lymphosarcoma in two bull mastiffs. *Vet Rec*. 145, 23-24
- Nilsson, A., De Milito, A., Engström, P., Nordin, M., Narita, M., Grillner, L., Chiodi, F., Björk, O. (2002) Current chemotherapy protocols for childhood acute lymphoblastic leukemia induce loss of humoral immunity to viral vaccination antigens. *Pediatrics*. 109(6), 1-6
- Onions, D. E. (1984). A prospective survey of familial canine lymphosarcoma. *J Natl Cancer Inst*. 72, 909-912
- 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. *J Gen Virol*. 69, 1111-1116
- Pelham, J. T., Irwin, P. J., Kay, P. H. (2003). Genetic hypomethylation in neoplastic cells from dogs with malignant lymphoproliferative disorders. *Res Vet Sci*. 74, 101-104
- Penn, I. (1974). Chemical immunosuppression and human cancer. *Cancer*. 34, 1474-1480
- Penn, I. (1990). Cancers complicating organ transplantation. *N Engl J Med*. 323, 1767-1771
- Pereira, C. A., Monezi, T. A., Mehnert, D. U., D'Angelo, M., Durigon, E. L. (2000). Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol*. 75, 127-133
- Pollock, R. V., (1982). Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell Vet*. 72, 103-119. [abstract] [versão electrónica] Acedido em Set. 27, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6211333>
- Pratelli, A. A., Cavalli, G., Normanno, M. G., Palma, G. D., Pastorelli, A. A., Buonavoglia, C., Martella, V. (2000). Imunization of pups with maternally derived antibodies to canine parvovirus (CPV) using a modified-live variant (CPV-2b). *J Vet Med*. 47, 273-276
- Prittie, J. (2004). Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *J Vet Emerg Crit Care* 14(3), 167-176
- 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 (1989-2000). *J Vet Intern Med*. 6, 576-580
- Reinhardt, D., Houliara, K., Pekrun, A., Lakomek, M., Krone, B. (2003). Impact of conventional chemotherapy on levels of antibodies against vaccine-preventable diseases in children treated for cancer. *Scand J Infect Dis*. 35, 851-857
- Rosol., T. J., Nagode, L. A., Couto, C. G., Hammer, A. S., Chew, D. J., Peterson, J. L, Ayl, R. D., Steinmeyer, C. L., Capen, C. C.(1992). Parathyroid hormone (PTH)-related protein, PTH, and 1,25-dihydroxyvitamin D in dogs with cancer-associated hypercalcemia. *Endocrinol* 131, 1157-1164. [abstract] [versão electrónica] Acedido em Set. 27, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Parathyroid%20hormone%20%28PTH%2>

9-related%20protein%2C%20PTH%2C%20and%201%2C25-dihydroxyvitamin%20D%20in%20dogs%20with%20cancer-associated%20hypercalcemia

- Rossi, G., Rossi, M., Vitali, C. G., Fortuna, D., Burroni, D., Pancotto, L., Capecchi, S., Sozzi, S., Renzoni, G., Braca, G., del Giudice, G., Rappuoli, R., Ghiara, P., Taccini, E. A. (1999). Conventional beagle dog model for acute and chronic infection with *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 67, 3112-3120
- Ruslander, D. A., Gebhard, D. H., Tompkins, M. B., Grindem, C. B., Page, R. L. (1997). Immunophenotypic characterizations of canine lymphoproliferative disorders. *In Vivo.* 11, 169-172. [abstract] [versão electrónica] Acedido em Set. 27, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9179611>
- Schultz, R. L. (2008). Current canine parvovirus type-2 (CPV-2) vaccines provide excellent immunity to all genotypes of CPV-2 (e.g. CPV-2a, 2b, and 2c). *Vet Ther.* 9(2), 94-101. [abstract] [versão electrónica] Acedido em Set. 27, 2012, disponível em: <http://www.freewebs.com/rcfbenefit2009/documents/seminardocs/CurrentParvoExcellentImmunityAllGenotypes.pdf>
- Shackelton, L. A., Parrish, C. R., Truyen, U., & Holmes, E. C. (2005). High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(2), 379-384
- Sherger, M., Kisseberth, W., London, C., Olivo-Marston, S., Papenfuss, T. L. 2012. Identification of myeloid derived suppressor cells in the peripheral blood of tumor bearing dogs. *BMC Veterinary Research.* 8, 209
- Siedek, E. M., Schmidt, H., Sture, G. H., Raue, R. (2011). Vaccination with canine parvovirus type 2 (CPV-2) protects against challenge with virulent CPV-2b and CPV-2c. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 124(1-2), 58-64. [abstract] [versão electrónica] Acedido em Set. 27, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Vaccination%20with%20canine%20parvovirus%20type%202%20%28CPV-2%29%20protects%20against%20challenge%20with%20virulent%20CPV-2b%20and%20CPV-2c>
- Simon, D., Moreno, S. N., Hirschberger, J., Moritz, A., Kohn, B., Neumann, S., Jurina, K., Scharvogel, S., Schwedes, C., Reinacher, M., Beyerbach, M., Nolte, I. (2008). Efficacy of a continuous, multiagent chemotherapeutic protocol versus a short-term single-agent protocol in dogs with lymphoma. *J Am Vet Med Assoc.* 232(6), 879-85
- Simonelli, C., Zaanussi, S., Cinelli, R., Dal Maso, L., Di Gennaro, G., D'Andrea, M., Nasti, G., Spina, M., Vaccher, E., De Paoli, P., Tirelli, U. (2003). Impact of concomitant antineoplastic chemotherapy and highly active antiretroviral therapy on human immunodeficiency virus (HIV) viremia and genotyping in HIV-infected patients with non-hodgkin lymphoma. *Clin Infect Dis.* 37, 820-827
- Spibey, N., Greenwood, N. M., Sutton, D., Chalmers, W. S., Tarpey, I. (2008). Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet Microbiol.* 128 (1-2), 48-55
- Stann, S. E., DiGiacomo, R. F., Giddens, W. E., Evermann, J. F. (1984). Clinical and pathological features of parvoviral diarrhoea in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 185: 651-654. [abstract] [versão electrónica] Acedido em Set. 27, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Clinical%20and%20pathological%20features%20of%20parvoviral%20diarrhoea%20in%20dogs>

- Sundberge, J. P., Smitha, K., Herrona, J., Jenson, B., Burk, R. D., Ranst, M. (1994). Involvement of canine oral papillomavirus in generalized oral and cutaneous verrucosis in a chinese Shar Pei dog. *Vet Pathol.* 31,183-187
- Täger, M. F., Zolezzi, P. R., Folatre, I. B., Navarrete, M. C. Rojas, J. P. (2006). Infecciones por virus respiratorios en niños con leucemia linfoblástica aguda y neutropenia febril: estudio prospectivo. *Rev Chil Infect.* 23 (2), 118-123
- Teske, E., van Heerde, P., Rutteman, G. R., Kurzman, I. D., Moore, P. F., MacEwen, E. G. (1994). Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 205, 1722-1728
- Tilburg, C. M., Sanders, E. A. M., Rovers, M. M., Wolfs, T. F. W., Bierings, M. B. (2006). Loss of antibodies and response to (re-)vaccination in children after treatment for acute lymphocytic leukemia: a systematic review. *Leukemia.* 20, 1717-1722
- Toman, M., Faldyna, M., Knotigova, P., Pokorova, D., Sinkora, J. (2002). Postnatal development of leukocyte subset composition and activity in dogs. *Vet Immunol and Immunopathol.* 87: 321-326
- Tomley, F. M., Armstrong, S. J., Mahy, B. W., Owen, L. N. (1983). Reverse transcriptase activity and particles of retroviral density in cultured canine lymphosarcoma supernatants. *Br J Cancer.* 42, 277-284
- Torben, E., Mellander, L., Hahn-Zoric, M., Abrahamsson, J. (2004). Intensive treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia reduces immune responses to diphtheria, tetanus, and *Haemophilus influenzae* type b. *J Pediatr Hematol Oncol.* 26(11), 727-734
- Trosko, J. E. (2001). Commentary: is the concept of "tumor promotion" a useful paradigm? *Mol Carcinog.* 30, 131-137
- Truyen, U. (2006). Evolution of canine parvovirus-A need for new vaccines? *Vet Microbiol.* 117, 9-13
- Twark, L., Dodds, W. J., (2000). Clinical use of serum parvovirus and distemper virus antibody titers for determining revaccination strategies in healthy dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 217(7), 1021-1025
- Vail, D. M., MacEwen, E. G., (2000). Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Investig.* 18(8), 781-792
- Vail, D. M., Young, K. M. (2007). Canine lymphoma and lymphoid leukemia. In: Withrow, S. J., MacEwen, E. G. (Ed.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology.* (4th ed). (pp. 699-733). St Louis, Missouri: Saunders Elsevier
- Vail, D. (2011). Tumours of the haemopoietic system. In: Dobson, J. M., Duncan, B., Lascelles, X. (Ed), *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology.* (3rd ed). (pp. 285-303). British Small Animal Veterinary Association
- Valerius, K. D., Ogilvie, G. K., Mallinckrodt, C. H., Getzy, D. M. (1997). Doxorubicin alone or in combination with asparaginase, followed by cyclophosphamide, vincristine, and prednisone for treatment of multicentric lymphoma in dogs: 121 cases (1987-1995). *J Am Vet Med Assoc.* 210(4), 512-6. [abstract] [versión electrónica] Acedido em Set. 27, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9040837>
- Valli, V. E., Myint, M. S., Barthel, A., Bienzle, D., Caswell, J., Colbatzky, F., Durham, A., Ehrhart, E. J., Johnson, Y., Jones, C., Kiupel, M., Labelle, P., Lester, S., Miller, M.,

- Moore, P., Moroff, S., Roccabianca, P., Ramos-Vara, J., Ross, A., Scase, T., Tvedten, H., Vernau, W. (2011). Classification of canine malignant lymphomas according to the world health organization criteria. *Vet Pathol.* 48(1), 198-211
- Veldhoen, N., Stewart, J., Brown, R., Milner, J. (1998). Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. *Oncogene.* 16, 249-255
- Vieira, M. J., Silva, E., Oliveira, J., Vieira, A. L., Decaro, N., Desario, C., Muller, A., Carneiro, J., Buonavoglia, C., Thompson, G. (2008). Canine parvovirus 2c infection in central Portugal. *J Vet Diagn Invest.* 20, 488-491
- Wagener, D. J. (Ed.). (2009). The history of oncology. Houten, the Netherlands: Springer. Acedido em Jun 21, 2012, disponível em: [http://books.google.pt/books?id=53fmwacXu44C&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.pt/books?id=53fmwacXu44C&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- 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. *J Vet Intern Med.* 20, 342-437
- Weiden, P. L., Storb, R., Kolb, H., Ochs, H. D., Graham, T. C., Tsoi, M., Schroeder, M., Thomas, E. D. (1974). Immune reactivity in dogs with spontaneous malignancy. *J Nat Cancer Instit.* 53(4), 1049-1056
- Winnicka, A., Jagielski, D., Hoffmann-Jagielska, M., Lechowski, R. (2002). Cytometric evaluation of peripheral blood lymphocytes in dogs with lymphoma during chemotherapy. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 49, 303-306
- World Small Animal Veterinary Association (2010). Guidelines for the vaccination of dogs and cats. Acedido em Jul 1, 2012, disponível em: <http://www.wsava.org/VGG1.htm>
- Zignol, M., Peracchi, M., Tridello, G., Pillon, M., Fregonese, F., D'Elia, R., ZanESCO, L., Cesaro, S. (2004). Assessment of humoral immunity to poliomyelitis, tetanus, hepatitis B, measles, rubella, and mumps in children after chemotherapy. *Cancer.* 101(3), 635-641

## **VIII. ANEXOS**



## ANEXO I – Conversão de peso vivo em área de superfície corporal

**Tabela 10:** Conversão de peso vivo em área de superfície corporal (ASC) em cães e gatos (adaptado de Chun, et al., 2007)

	<b>Peso (kg)</b>	<b>ASC (m<sup>2</sup>)</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>ASC (m<sup>2</sup>)</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>ASC (m<sup>2</sup>)</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>ASC (m<sup>2</sup>)</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>ASC (m<sup>2</sup>)</b>
<b>Cão</b>	<b>1,0</b>	0,101	<b>11,0</b>	0,500	<b>21,0</b>	0,769	<b>31,0</b>	0,997	<b>41,0</b>	1,201
	<b>2,0</b>	0,160	<b>12,0</b>	0,529	<b>22,0</b>	0,785	<b>32,0</b>	1,018	<b>42,0</b>	1,220
	<b>3,0</b>	0,210	<b>13,0</b>	0,553	<b>23,0</b>	0,817	<b>33,0</b>	1,029	<b>43,0</b>	1,240
	<b>4,0</b>	0,255	<b>14,0</b>	0,581	<b>24,0</b>	0,840	<b>34,0</b>	1,060	<b>44,0</b>	1,259
	<b>5,0</b>	0,295	<b>15,0</b>	0,608	<b>25,0</b>	0,864	<b>35,0</b>	1,081	<b>45,0</b>	1,278
	<b>6,0</b>	0,333	<b>16,0</b>	0,641	<b>26,0</b>	0,886	<b>36,0</b>	1,101	<b>46,0</b>	1,297
	<b>7,0</b>	0,370	<b>17,0</b>	0,668	<b>27,0</b>	0,909	<b>37,0</b>	1,121	<b>47,0</b>	1,302
	<b>8,0</b>	0,404	<b>18,0</b>	0,694	<b>28,0</b>	0,931	<b>38,0</b>	1,142	<b>48,0</b>	1,334
	<b>9,0</b>	0,437	<b>19,0</b>	0,719	<b>29,0</b>	0,953	<b>39,0</b>	1,162	<b>49,0</b>	1,352
	<b>10,0</b>	0,469	<b>20,0</b>	0,744	<b>30,0</b>	0,975	<b>40,0</b>	1,181	<b>50,0</b>	1,371
	<b>Peso (kg)</b>	<b>ASC (m<sup>2</sup>)</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>ASC (m<sup>2</sup>)</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>ASC (m<sup>2</sup>)</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>ASC (m<sup>2</sup>)</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>ASC (m<sup>2</sup>)</b>
<b>Gato</b>	<b>0,2</b>	0,034	<b>2,2</b>	0,169	<b>4,2</b>	0,260	<b>6,2</b>	0,337	<b>8,2</b>	0,407
	<b>0,4</b>	0,054	<b>2,4</b>	0,179	<b>4,4</b>	0,269	<b>6,4</b>	0,345	<b>8,4</b>	0,413
	<b>0,6</b>	0,071	<b>2,6</b>	0,189	<b>4,6</b>	0,277	<b>6,6</b>	0,352	<b>8,6</b>	0,420
	<b>0,8</b>	0,086	<b>2,8</b>	0,199	<b>4,8</b>	0,285	<b>6,8</b>	0,360	<b>8,8</b>	0,426
	<b>1,0</b>	0,100	<b>3,0</b>	0,208	<b>5,0</b>	0,292	<b>7,0</b>	0,366	<b>9,0</b>	0,433
	<b>1,2</b>	0,113	<b>3,2</b>	0,217	<b>5,2</b>	0,300	<b>7,2</b>	0,373	<b>9,2</b>	0,439
	<b>1,4</b>	0,125	<b>3,4</b>	0,226	<b>5,4</b>	0,307	<b>7,4</b>	0,380	<b>9,4</b>	0,445
	<b>1,6</b>	0,137	<b>3,6</b>	0,235	<b>5,6</b>	0,315	<b>7,6</b>	0,387	<b>9,6</b>	0,452
	<b>1,8</b>	0,148	<b>3,8</b>	0,244	<b>5,8</b>	0,323	<b>7,8</b>	0,393	<b>9,8</b>	0,458
	<b>2,0</b>	0,159	<b>4,0</b>	0,252	<b>6,0</b>	0,330	<b>8,0</b>	0,400	<b>10,0</b>	0,464



## ANEXO II – Classificação anatômica do linfoma canino

**Tabela 11:** Características clínicas do linfoma canino em várias localizações anatômicas (adaptado de Vail & Young, 2007)

Localização Anatômica	Sinais Clínicos	Diagnóstico	Diagnóstico Diferencial
<b>Multicêntrico</b> (80%)	<p>Linfadenopatia indolor; Sinais inespecíficos (20-40% dos casos): letargia, perda de peso, anorexia; Espleno e hepatomegália. Possível envolvimento da medula óssea.</p> <p>Síndromes paraneoplásicas: anemia, trombocitopenia e neutropenia. PU/PD se hipercalcemia;</p>	<p>Biópsia do linfonodo afetado (PAAF ou intracirúrgica);</p> <p>Estadiamento</p>	<p>Infecções disseminadas (ex.: bactérias, vírus, rickettsias, parasitas, fungos); Doenças imunomediadas (ex.: dermatopatias, vasculites, poliartrites, lupus); Metastização nos linfonodos; Outros tumores hematopoiéticos (ex.: leucemia, mieloma múltiplo, histiocitose maligna ou sistêmica).</p>
<b>Alimentar</b> (7%)	<p>Sinais GI inespecíficos (vômito, diarreia, perda de peso, panhipoproteinemia e má absorção); Massa abdominal ou espessamento das ansas intestinais (que podem ser palpáveis); Possível envolvimento dos linfonodos mesentéricos, baço e fígado.</p>	<p>Exames imagiológicos abdominais (radiografia, ecografia). Biópsia (PAAF ecoguiada, por endoscopia, ou cirúrgica).</p> <p>Estadiamento</p>	<p>Enterites primárias ou secundárias; Enterite infiltrativa (linfocítica e plasmocítica); Outros tumores GI.</p>
<b>Cutâneo</b> (6%)	<p>É normalmente generalizado. Alterações inespecíficas da pele. Pode haver progressão de alopecia com descamação para hipertrofia eritematosa e ulcerativa ou ainda lesões tipo placa. Cerca de metade dos casos apresentam prurido. Pode envolver a mucosa oral, linfonodos, baço, fígado e medula óssea.</p>	<p>Biópsia cutânea de múltiplos locais afetados.</p> <p>Estadiamento</p>	<p>Dermatite infecciosa; Dermatite imunomediada (ex.: penfigos); Outros tumores cutâneos.</p>
<b>Mediastínico</b> (4%)	<p>Dispneia/taquipneia devido a efusão pleural ou à própria massa; intolerância ao exercício e possível regurgitação; Síndrome da veia cava (edema da face, pescoço e membros anteriores); Aumento dos linfonodos crânio-mediastínicos e/ou timo; Síndromes paraneoplásicas: PU/PD se hipercalcemia.</p>	<p>Radiografia torácica; Biópsia (PAAF ecoguiada ou cirúrgica); Análise da efusão pleural se presente.</p> <p>Estadiamento</p>	<p>Outros tumores (ex.: timoma, quemodectoma, carcinoma da tireoide, carcinomatose pleural); Doenças infecciosas (doença granulomatosa, piotórax); Insuficiência cardíaca congestiva; Quilotórax; Hemotórax.</p>
<b>Extranodal</b> (3%)	<p>Dependentes do local.</p> <p>Linfoma do SNC: convulsões, paralisias e parésias Linfoma ocular: infiltração e espessamento da íris, uveíte, hipópion, hífema, sinéquia posterior e glaucoma.</p>	<p>Exames imagiológicos do local afetado. Biópsia: tecido ou fluido do local afetado.</p> <p>Estadiamento</p>	<p>Variável, dependentes do local afetado.</p>

PAAF – Punção aspirativa por agulha fina; GI – Gastrointestinal; SNC – Sistema nervoso central

PU – Poliúria; PD - Polidipsia



## ANEXO III – Fármacos antineoplásicos mais utilizados no tratamento do linfoma canino

**Tabela 12:** Fármacos antineoplásicos mais utilizados no tratamento do linfoma canino: mecanismo de acção, toxicidade e indicações (adaptado de Chun, et al., 2007; Lana & Dobson, 2011)

Grupo	Mecanismo de acção	Fármaco	Farmacocinética / Farmacodinâmica	Dose (cão)	Toxicidade	Indicações
Agentes alquilantes	Não específicos de fase do ciclo celular. Alteração do ADN por inserção de um grupo alçilo. Inibição da síntese de ADN, ARN e proteínas.	Ciclofosfamida	Activação e metabolização no fígado; excreção renal.	200-300 mg/m <sup>2</sup> , cada 3 semanas. Dose total administrada durante um período de 3-4 dias.	Depressão da medula óssea (neutropénia, trombocitopénia) com <i>nadir</i> aproximadamente aos 7 dias; possível toxicidade GI, alopecia e cistite hemorrágica estéril.	Vários protocolos de associação para linfomas, leucemias, sarcomas e carcinomas.
		Clorambucilo	Activação e metabolização no fígado. Excreção renal e biliar.	Variável: 0,1 mg/kg ou 2-8 mg/m <sup>2</sup> q24-48h.	Bem tolerado. Possível toxicidade GI ligeira, depressão da medula óssea (2-3 semanas após administração); toxicidade cerebelar e alopecia raras.	Linfoma, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiplo, mastocitoma.
		Ifosfamida	Excreção urinária.	350-375 mg/m <sup>2</sup> IV, cada 3 semanas, acompanhada de fluidoterapia.	Cistite hemorrágica estéril, depressão da medula óssea.	Vários tumores (ex.: linfoma).
		Lomustina	Lipofílica – boa penetração no SNC. Metabolização hepática e excreção urinária.	60-90 mg/m <sup>2</sup> PO, cada 3 semanas.	Depressão da medula óssea (possível mielodepressão aguda aos 7-10 dias). Hepatotxicidade.	Linfoma (especialmente cutâneo), e mastocitoma. Neoplasias cerebrais.
		Dacarbazina	Metabolização e excreção renais e biliares.	200 mg/m <sup>2</sup> IV lento, q24h, 5 dias, cada 3 semanas; ou 1000 mg/m <sup>2</sup> IV lento num período de 4h, cada 3 semanas.	Depressão da medula óssea, vômito e alopecia. Acção vesicante.	Protocolos de resgate para linfoma.
Alcalóides vegetais	Específicos de fase do ciclo celular. Ligação aos microtúbulos e prevenção da formação do fuso mitótico, impedindo a divisão celular.	Vincristina	Excreção biliar.	0,5-0,75 mg/m <sup>2</sup> IV, semanalmente ou como parte de um protocolo de associação de fármacos.	Vesicante. Possível alopecia, toxicidade GI. Raramente neuropatia periférica. A mielodepressão é considerada mínima, podendo ocorrer se em associação com outros fármacos.	Vários protocolos de associação de fármacos para linfoma, leucemias, sarcomas e mastocitomas. Tumor venéreo transmissível. Maneio de trombocitopénia imunomediada.
		Vimblastina	Metabolização hepática e excreção biliar.	2 mg/m <sup>2</sup> IV, semanalmente ou de acordo com protocolos específicos.	Mielodepressão com <i>nadir</i> aos 4-9 dias, alopecia, toxicidade GI ligeira. Acção vesicante. Possível neurotoxicidade.	Mastocitoma e linfoma.

**Tabela 12: (Continuação)**

Grupo	Mecanismo de acção	Fármaco	Farmacocinética / Farmacodinâmica	Dose (cão)	Toxicidade	Indicações
Anti-metabolitos	Específicos de fase do ciclo celular. Interferem na síntese de ácidos nucleicos, por substituição dos metabolitos normais e inibição das reacções enzimáticas normais.	Metotrexato	Inibe a síntese de ácido fólico. Metabolização parcial pela flora GI e pelo fígado. Excreção renal.	0,6-0,8 mg/kg IV ou PO; 2,5 mg/m <sup>2</sup> PO, IV, IM, SC, q24h; ou integrando um protocolo de associação de fármacos específico.	Possível toxicidade GI (vómito, diarreia, anorexia), mielodepressão com <i>nadir</i> aos 6-9 dias, alopecia, nefro e hepatotoxicidade.	Protocolos de associação de fármacos para linfoma, sertolinomas e osteossarcomas.
		Citarabina (citosina arabinosida)	Análogo das pirimidinas, que inibe a síntese de ADN. Excreção urinária.	100 mg/m <sup>2</sup> IV infusão contínua, q24h, 3-4 dias; 150 mg/m <sup>2</sup> SC q12h, 2 dias ou 600 mg/m <sup>2</sup> IV ou SC semanalmente.	Toxicidade GI, alopecia e mielodepressão.	Linfoma (especialmente com envolvimento do SNC) e leucemias.
Antibióticos antineoplásicos (antraciclina)	Não específico de fase do ciclo celular. Integram o ADN, prevenindo a sua síntese e a síntese de ARN	Doxorrubicina	Metabolização hepática e excreção biliar.	30 mg/m <sup>2</sup> IV, cada 2-3 semanas, com fluidoterapia.	Mielodepressão com <i>nadir</i> aos 7-10 dias. Alopecia, toxicidade GI (colite hemorrágica), reacções alérgicas. Acção vesicante. Possível toxicidade cardíaca e renal.	Variadas. Linfomas, leucemias, osteossarcomas, hemangiossarcomas, adenocarcinomas mamários.
		Mitoxantrona	Inibição da topoisomerase II. Metabolização hepática. Excreção biliar e urinária.	5,5 mg/m <sup>2</sup> IV, cada 3 semanas, com fluidoterapia.	Mielodepressão com <i>nadir</i> aos 7-10 dias. Possível toxicidade GI ligeira, alopecia. Ligeira acção vesicante.	Fármaco de resgate em linfoma, ou como substituto da doxorrubicina. Carcinoma das células de transição e das células escamosas.
		Dactinomicina (actinomicina D)	Excreção biliar e renal.	0,5-0,9 mg/m <sup>2</sup> IV, cada 2-3 semanas, com fluidoterapia.	Mielodepressão com <i>nadir</i> aos 7-10 dias, alopecia. Rara toxicidade GI. Acção vesicante.	Fármaco de resgate em linfoma ou como substituto da doxorrubicina.
		Hidroxicarbamida (hidroxiureia)	Inibe a conversão de ribonucleótidos em desoxiribonucleótidos. Específica da fase S. Metabolização hepática e excreção urinária.	50 mg/kg PO q24h.	Mielodepressão e toxicidade GI.	Policitémia <i>vera</i> e leucemias.
		Prednisona / Prednisolona	Inibição da síntese de ADN. Metabolização hepática.	Variável. Geralmente 1-2 mg/kg q24h.	Hiperadrenocorticism iatrogénico, PU, PD, hepatomegália, alopecia, úlceras GI.	Linfomas, mastocitoma e leucemias.
		L-asparaginase	Enzima bacteriana que degrada a asparaginase, necessária à síntese proteica pelas células tumorais.	400 UI/kg IM ou SC; dose máxima: 10000 UI/m <sup>2</sup> IM ou SC.	Anafilaxia se doses repetidas. Mielodepressão, pancreatite e CID raras.	Vários protocolos de associação de fármacos para linfoma.

ADN - Ácido desoxirribonucleico; ARN - Ácido ribonucleico; SNC - Sistema nervoso central; GI - Gastrointestinal; PU - Poliúria; PD - Polidipsia; mg - miligrama; m<sup>2</sup> - metro quadrado; kg - kilograma; qxh - *quaque x hour* (uma vez a cada x horas); UI - Unidades internacionais  
 IV - Intravenoso; PO - *per os* (via oral); IM - Intramuscular; SC - Subcutâneo; CID - Coagulação intravascular disseminada

## ANEXO IV – Características do grupo oncológico, do grupo controlo e do grupo de animais com parvovirose

**Tabela 13:** Características do grupo oncológico

Animal	Nome	Idade (anos)	Género	Raça	CHOP (19/25)	Data início CHOP	Última vacinação CPV
A	Cuca	9	F	Pastor A.	25	5.4.2012	18.6.2011
B	Boris <sup>1</sup>	11	M	Pastor A.	25	12.4.2012	30.3.2009
C	Max <sup>1</sup>	6	M	Golden R.	25	8.5.2012	21.12.2011
D	Lucky	9	M	Pastor A.	25	19.6.2012	26.4.2012
E	Okapi <sup>1</sup>	6	F	Dobermann	25	6.7.2012	10.10.2011
F	Sebastião <sup>1,2</sup>	8	M	Labrador R.	19	9.7.2012	8.6.2012
G	Nicky	8	F	Pastor A.	19	23.7.2012	2.3.2012
H	Salvador	6	M	Boxer	19	31.7.2012	12.8.2011

<sup>1</sup> Estes animais faleceram após o período de colheitas.

<sup>2</sup> Este animal contraiu uma infecção por CPV em cachorro.

**Tabela 14:** Características do grupo controlo

Animal	Nome	Idade (anos)	Género	Raça	Data início Colheitas	Última vacinação CPV
I	Charlie	8	M	Labrador R.	12.7.2012	21.12.2010
J	Khyara	5	F	Dobermann	16.7.2012	29.4.2010
L	Patek	6	M	Golden R.	1.8.2012	31.8.2011
M	D. Ruan	3	M	Boxer	3.8.2012	1.7.2011
N	Rola	7	F	Pastor A.	6.8.2012	27.9.2011
O	Fluffy	8	F	Pastor A.	6.8.2012	14.10.2011
P	Spot	11	M	Pastor A.	6.8.2012	1.8.2010
Q	Tico	9	M	Pastor A.	6.8.2012	11.10.2011

**Tabela 15:** Características do grupo de animais com parvovirose

Animal	Nome	Idade (meses)	Género	Raça	Estado Vacinal
1	Janinha	9	F	Indeterminada	Não vacinado
2	Ritinha	4	F	Indeterminada	Não vacinado
3	Saké	10	M	Bull Terrier	Não vacinado
4	Golias <sup>1</sup>	2,5	M	Dálmata	Não vacinado
5	Pintas	2,5	M	Dálmata	Não vacinado
6	Bobby <sup>1</sup>	2,5	M	Dálmata	Não vacinado
7	Pitucha <sup>1</sup>	2,5	F	Dálmata	Não vacinado
8	Zappa	2,5	M	Dálmata	Não vacinado

<sup>1</sup> Estes animais faleceram no decurso da infecção por CPV.



## ANEXO V – Hemogramas dos animais estudados

Tabela 16: Hemogramas dos animais dos grupos oncológico e controlo, ao longo do tempo

Grupo	Animal	Colheita	GV	Hb	Htc	VCM	HCM	CHCM	Plaqts	Leuc	Neut n Seg	Neut Seg	Linf	Mon	Eosin	Bas
Oncológico	A	T0	5,53	12,60	38,80	70,20	22,70	32,40	395,00	9,04	0,00	8136,00	723,00	181,00	0,00	0,00
		T1	5,03	11,70	35,10	69,80	23,30	33,40	351,00	24,70	0,00	20995,00	3211,00	494,00	0,00	0,00
		T2	5,32	12,50	36,80	69,20	23,50	33,90	534,00	11,50	0,00	8625,00	1840,00	920,00	115,00	0,00
		T3	4,94	11,80	33,70	68,20	23,80	35,00	162,00 <sup>1</sup>	5,17	0,00	4239,00	672,00	259,00	0,00	0,00
	B	T0	4,46	10,90	32,40	72,60	24,40	33,60	48,80 <sup>1</sup>	9,10	0,00	6825,00	910,00	1365,00	0,00	0,00
		T1	4,17	9,68	30,20	72,50	23,20	32,00	518,00	51,30	0,00	46170,00	1026,00	4104,00	0,00	0,00
		T2	4,73	12,00	34,60	73,00	25,30	34,60	577,00	9,88	0,00	6224,00	3063,00	494,00	99,00	0,00
		T3	5,34	13,20	38,00	71,20	24,60	34,60	412,00	4,19	0,00	2556,00	1257,00	293,00	84,00	0,00
	C	T0	5,78	13,70	40,40	70,00	23,70	33,90	172,00 <sup>1</sup>	12,30	0,00	8241,00	3321,00	738,00	0,00	0,00
		T1	4,97	12,20	36,70	73,70	24,60	33,40	306,00	23,80	0,00	20468,00	1666,00	1666,00	0,00	0,00
		T2	5,26	12,80	37,90	72,10	24,40	33,90	345,00	10,60	0,00	6360,00	3604,00	636,00	0,00	0,00
		T3	4,97	12,00	35,60	71,80	24,20	33,80	226,00	5,32	0,00	2873,00	1915,00	532,00	0,00	0,00
	D	T0	7,03	15,90	46,00	65,40	22,60	34,50	299,00	16,40	0,00	10004,00	4592,00	1476,00	328,00	0,00
		T1	5,85	13,40	38,50	65,80	22,90	34,90	230,00	17,60	0,00	16192,00	528,00	880,00	0,00	0,00
		T2	5,20	11,70	33,90	65,20	22,50	34,50	434,00	21,50	0,00	11395,00	9460,00	645,00	0,00	0,00
		T3	5,16	12,00	34,50	66,90	23,20	34,60	467,00	19,10	0,00	7831,00	9550,00	1146,00	573,00	0,00
	E	T0	7,05	15,40	45,90	65,10	21,90	33,60	347,00	26,55	0,00	22833,00	1062,00	2390,00	266,00	0,00
		T1	7,42	16,10	47,90	64,60	21,70	33,70	213,00	13,40	0,00	10184,00	1742,00	1340,00	134,00	0,00
		T2	6,78	15,20	44,20	65,20	22,40	34,40	398,00	14,20	0,00	10792,00	1846,00	852,00	710,00	0,00
		T3	7,27	15,80	47,80	66,92	21,70	33,60	330,00	20,60	ND	18450,00	1000,00	280,00	100,00	0,00
	F	T0	3,70	8,20	26,00	72,51	22,20	32,40	265,00	4,62	ND	350,00	3200,00	850,00	0,00	0,01
		T1 <sup>2</sup>	2,97	7,76	23,20	78,20	26,20	33,50	3,99 <sup>1</sup>	7,99	0,00	6392,00	1199,00	400,00	0,00	0,00
		T2	4,48	11,40	34,63	76,60	25,30	33,10	266,00	13,90	0,00	11537,00	1529,00	834,00	0,00	0,00
		T3	4,54	13,54	41,47	101,72	30,70	34,00	244,40	1,75	0,00	17952,57	1437,34	759,43	281,70	0,00
G	T0	4,71	11,60	30,30	64,40	24,60	38,30	189,00	7,30	0,00	4526,00	2044,00	584,00	146,00	0,00	
	T1	4,08	9,00	31,00	76,00	22,10	29,00	499,00	9,38	0,00	6566,00	1219,00	1219,00	281,00	0,00	
	T2	6,03	17,57	54,83	108,65	31,60	33,31	158,67	36,20	0,00	11196,89	1529,24	1739,15	415,87	0,00	
	T3	5,88	12,70	44,20	78,09	21,60	30,24	725,00	6,50	ND	3770,00	1600,00	350,00	480,00	0,00	
H	T0	4,41	11,00	34,00	76,90	24,80	32,20	184,00 <sup>1</sup>	29,40	0,00	23520,00	4410,00	1470,00	0,00	0,00	
	T1	4,15	10,50	31,70	79,91	25,40	33,84	562,00	13,20	ND	10050,00	1300,00	950,00	200,00	0,00	
	T2	5,04	12,30	37,80	78,21	24,30	33,12	669,00	7,80	ND	4550,00	2200,00	150,00	680,00	0,00	
	T3	5,58	13,30	41,80	78,09	23,80	32,56	455,00	11,20	ND	7060,00	2100,00	420,00	1250,00	0,00	
Controlo	I	T0	8,30	18,60	54,20	65,30	22,40	34,30	122,00 <sup>1</sup>	12,40	0,00	10292,00	2480,00	868,00	0,00	0,00
		T1	7,43	17,00	48,20	64,80	22,80	35,20	193,00	13,10	0,00	9956,00	2096,00	1048,00	0,00	0,00
		T2	7,67	17,00	53,00	70,93	22,20	32,96	161,00	10,50	ND	6670,00	2600,00	350,00	480,00	0,00
		T3	7,78	16,80	53,60	70,81	21,50	32,16	165,00	9,60	ND	5410,00	2600,00	350,00	870,00	0,00
	J	T0	6,95	15,50	45,00	64,80	22,30	34,40	168,00 <sup>1</sup>	9,44	0,00	6136,00	2360,00	566,00	378,00	0,00
		T1	7,09	15,50	45,60	64,30	21,90	34,00	164,00	9,04	0,00	5695,00	2260,00	633,00	452,00	0,00
		T2	6,66	14,80	43,80	65,80	22,20	33,70	205,00	9,39	0,00	6479,00	2254,00	376,00	282,00	0,00
		T3	6,47	13,90	43,00	67,89	21,50	33,04	130,00	8,80	ND	5990,00	1800,00	280,00	480,00	0,00
	L	T0	7,61	18,00	52,20	68,60	23,60	34,40	299,00	7,69	0,00	4768,00	1307,00	692,00	923,00	0,00
		T1	8,13	19,10	56,00	68,80	23,50	34,10	251,00	10,50	0,00	6825,00	2625,00	630,00	420,00	0,00
		T2	8,04	18,70	55,60	69,10	23,20	33,60	322,00	7,14	0,00	4284,00	1999,00	357,00	500,00	0,00
		T3	8,87	20,40	62,10	72,14	23,00	33,52	198,00	6,80	ND	3390,00	2600,00	220,00	480,00	0,00
	M	T0	7,25	16,70	48,00	66,30	23,00	34,70	51,40 <sup>1</sup>	10,40	0,00	8008,00	1248,00	832,00	312,00	0,00
		T1	7,18	16,50	47,20	65,70	23,00	35,00	147,00 <sup>1</sup>	11,90	0,00	9163,00	1428,00	1190,00	119,00	0,00
		T2	7,36	16,50	48,90	67,89	22,40	34,16	48,00	10,00	ND	6190,00	2600,00	420,00	480,00	0,10
		T3	7,81	17,60	49,70	64,37	22,50	35,44	91,00	7,30	ND	4450,00	2000,00	280,00	290,00	0,00
	N	T0	6,33	15,80	45,60	72,00	24,90	34,60	276,00	15,50	0,00	11780,00	2480,00	930,00	775,00	0,00
		T1	6,15	15,70	44,40	72,10	25,50	35,40	383,00	15,80	0,00	12640,00	1422,00	1738,00	0,00	0,00
		T2	6,79	16,70	51,70	79,43	24,50	33,04	362,00	12,20	ND	7930,00	2600,00	420,00	770,00	0,10
		T3	6,55	16,70	47,90	75,91	25,40	35,04	496,00	11,50	ND	7440,00	2600,00	420,00	580,00	0,10
	O	T0	7,10	16,40	46,70	65,80	23,10	35,00	204,00	9,31	0,00	6703,00	1862,00	745,00	0,00	0,00
		T1	7,17	16,60	47,30	66,00	23,20	35,20	218,00	12,30	0,00	8241,00	3198,00	861,00	0,00	0,00
		T2	7,27	16,30	49,70	70,20	22,40	33,44	234,00	11,40	ND	7150,00	2900,00	420,00	480,00	0,10
		T3	7,99	17,90	52,70	67,29	22,40	34,32	326,00	11,30	ND	6960,00	3100,00	350,00	480,00	0,00
P	T0	8,45	19,40	55,80	66,10	23,00	34,70	126,00 <sup>1</sup>	8,43	0,00	5817,00	2108,00	506,00	0,00	0,00	
	T1	8,02	18,70	53,60	66,90	23,40	34,90	134,00	7,77	0,00	5594,00	1554,00	622,00	0,00	0,00	
	T2	8,45	19,40	59,30	72,26	23,00	33,44	124,00	9,80	ND	7440,00	1400,00	350,00	200,00	0,00	
	T3	9,02	20,90	61,10	69,35	23,20	34,64	169,00	6,80	ND	4350,00	1900,00	220,00	290,00	0,00	
Q	T0	5,39	12,00	36,90	67,80	22,70	33,60	6,62 <sup>1</sup>	6,00	0,00	3922,00	1431,00	318,00	150,00	0,00	
	T1	5,77	12,90	39,60	68,70	22,40	32,60	86,50 <sup>1</sup>	14,10	0,00	9306,00	4371,00	423,00	0,00	0,00	
	T2	6,32	13,80	42,00	67,77	21,80	33,44	109,00	11,50	ND	5130,00	5700,00	280,00	200,00	0,00	
	T3	6,57	14,40	46,40	72,87	21,90	32,00	138,00	10,20	ND	5610,00	3800,00	350,00	200,00	0,10	

<b>Parâmetro</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Valor de Referência</b>
Eritrócitos	GV	5,5 - 8,5 10 <sup>6</sup> / µL
Hemoglobina	Hb	12 - 18 g/dl
Hematócrito	Htc	37 - 55 %
Volume Corpuscular Médio	VCM	60 - 77 fl
Hemoglobina Corpuscular Média	HCM	19,5 - 24,5 pg
Concentração Hemoglobina Corpuscular Média	CHCM	32 - 36 g/dl
Plaquetas	Plaqs	200 - 500 10 <sup>3</sup> / µL
Leucócitos	Leuc	6 - 17 x 10 <sup>3</sup> / µL
Neutrófilos não segmentados	Neut n seg	0 - 300 / µL
Neutrófilos segmentados	Neut seg	3000 - 11500 / µL
Linfócitos	Linf	1000 - 4800 / µL
Monócitos	Mon	150 - 1350 / µL
Eosinófilos	Eosin	100 - 1250 / µL
Basófilos	Bas	Raros

<sup>1</sup> Com agregação plaquetária.

<sup>2</sup> Com coágulo no tubo de EDTA

ND: Não Disponível

## ANEXO VI – Detecção e quantificação de CPV nos leucócitos, plasma e fezes

Tabela 17: Quantificação de CPV (moléculas/ $\mu$ L) nos leucócitos, plasma e fezes dos animais estudados

Grupo	Animal	Colheita	Leucócitos	Plasma	Fezes	Grupo	Animal	Colheita	Leucócitos	Plasma	Fezes
Oncológico	A	T0	0,00	6,25	11,26	Controlo	I	T0	1,15	3,89	13,00
		T1	ND	ND	ND			T1	3,69	7,38	189,42
		T2	0,00	3,87	1,82			T2	0,00	3,13	1,12
		T3	0,00	0,00	0,00			T3	0,00	0,49	1,48
	B	T0	0,00	0,00	0,00		J	T0	0,00	2,59	2,32
		T1	0,00	5,92	0,00			T1	0,00	18,62	7,00
		T2	0,00	1,21	0,00			T2	3,04	213,40	194,48
		T3	6,95	1197,74	45,59			T3	2,76	5,88	2,14
	C	T0	0,00	1,98	0,00		L	T0	0,00	21,82	23,72
		T1	0,00	19,93	8,28			T1	0,00	23,86	8,07
		T2	0,00	10,52	0,00			T2	1,40	208,22	52,33
		T3	0,00	0,00	0,00			T3	0,00	22,30	3,58
	D	T0	3,02	4,87	0,00	M	T0	0,99	0,00	1,62	
		T1	0,00	0,00	0,00		T1	1,89	167,36	12,26	
		T2	196,73	23,22	0,00		T2	0,00	19,62	0,00	
		T3	5,21	0,00	0,00		T3	0,00	0,00	0,00	
	E	T0	0,00	0,00	7,18	N	T0	0,00	2,66	4,98	
		T1	3,25	0,00	3,56		T1	1,99	370,12	12,78	
		T2	2,72	0,00	0,00		T2	0,00	23,12	0,00	
		T3	10,00	7,43	0,00		T3	0,00	0,00	0,00	
	F	T0	8,96	3,09	0,00	O	T0	0,00	0,00	0,00	
		T1	29,50	44,80	0,00		T1	3,36	178,42	17,59	
		T2	1,98	0,00	0,00		T2	0,00	14,30	0,00	
		T3	42,55	2,91	0,93		T3	0,00	3,45	0,00	
	G	T0	11,04	5,02	0,00	P	T0	0,00	2,08	1,25	
		T1	7,49	14,98	0,00		T1	0,00	306,96	34,57	
		T2	4,96	56,54	0,00		T2	0,00	10,32	0,00	
		T3	0,00	2,63	1,70		T3	0,00	0,00	0,00	
	H	T0	0,00	9,88	1,01	Q	T0	0,00	2,14	0,00	
		T1	0,00	3,26	0,00		T1	1296,16	255,96	21,39	
		T2	2,36	0,00	1,44		T2	0,00	0,00	0,00	
		T3	0,00	1,25	0,00		T3	0,00	2,80	0,00	

Tabela 17: (Continuação)

Grupo	Animal	Colheita	Leucócitos	Plasma	Fezes
Cães com parvovirose	1	ND	$8,92 \times 10^{04}$	$1,77 \times 10^{05}$	$1,19 \times 10^{09}$
	2	ND	$1,03 \times 10^{04}$	$9,20 \times 10^{04}$	$4,25 \times 10^{05}$
	3	ND	$3,72 \times 10^{05}$	$7,90 \times 10^{04}$	$6,66 \times 10^{07}$
	4	ND	$3,43 \times 10^{07}$	$5,20 \times 10^{05}$	$3,90 \times 10^{09}$
	5	ND	$6,78 \times 10^{07}$	$2,28 \times 10^{10}$	$1,90 \times 10^{10}$
	6	ND	$1,10 \times 10^{08}$	$2,44 \times 10^{10}$	$2,24 \times 10^{09}$
	7	ND	$9,94 \times 10^{07}$	$1,20 \times 10^{07}$	$1,53 \times 10^{09}$
	8	ND	$3,06 \times 10^{06}$	$1,50 \times 10^{09}$	$2,93 \times 10^{07}$

ND: Não Disponível

Figura 5: Detecção de CPV através de qPCR (originais)

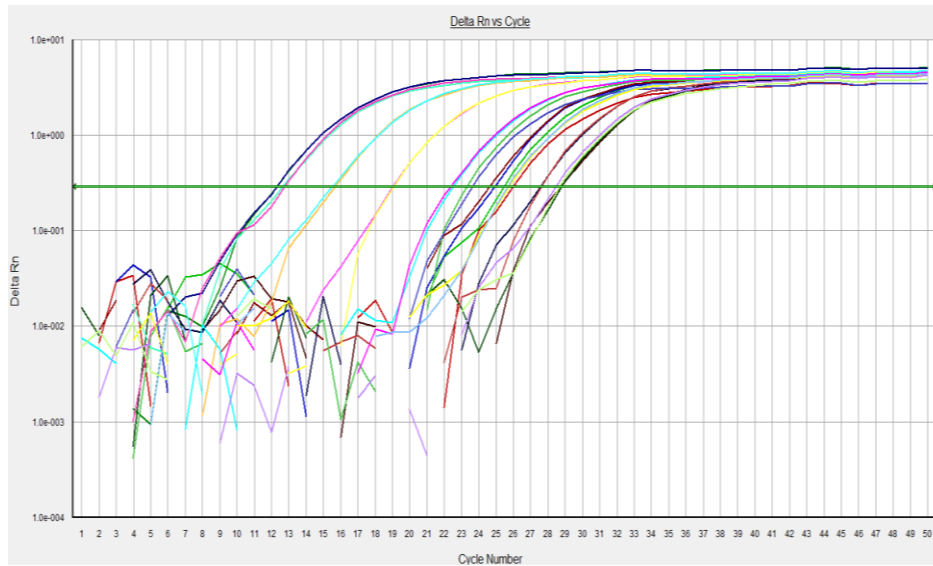


Fig. 5a: Curvas de amplificação com CT (*cycle threshold*) precoce, correspondentes a amostras com maior concentração de CPV (ex: cães com infecção por CPV);

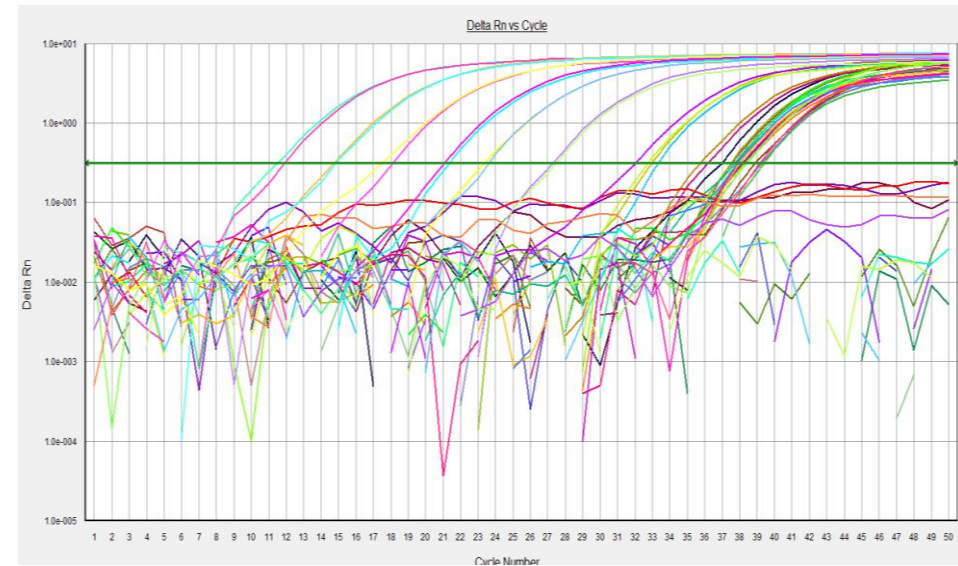


Fig. 5b: Curvas de amplificação com CT (*cycle threshold*) tardio, correspondentes a amostras com menor concentração de CPV (ex: animais do grupo oncológico e controle);

## ANEXO VII – Detecção de anticorpos plasmáticos anti-CPV

**Tabela 18:** Detecção de Ac plasmáticos anti-CPV, através de ELISA semiquantitativo, nos animais do grupo oncológico, do grupo controlo e do grupo da parvovirose

Grupo	Animal	Colheita	Ac anti-CPV	Grupo	Animal	Colheita	Ac anti-CPV
<b>Oncológico</b>	A	T0	≥ 1:80	<b>Controlo</b>	I	T0	≥ 1:80
		T2	< 1:80			T2	≥ 1:80
		T3	≥ 1:80			T3	≥ 1:80
	B	T0	≥ 1:80		J	T0	≥ 1:80
		T2	≥ 1:80			T2	≥ 1:80
		T3	≥ 1:80			T3	≥ 1:80
	C	T0	≥ 1:80		L	T0	≥ 1:80
		T2	≥ 1:80			T2	≥ 1:80
		T3	≥ 1:80			T3	≥ 1:80
	D	T0	≥ 1:80		M	T0	≥ 1:80
		T2	≥ 1:80			T2	≥ 1:80
		T3	≥ 1:80			T3	≥ 1:80
	E	T0	≥ 1:80		N	T0	≥ 1:80
		T2	≥ 1:80			T2	≥ 1:80
		T3	≥ 1:80			T3	≥ 1:80
	F	T0	≥ 1:80		O	T0	≥ 1:80
		T2	≥ 1:80			T2	< 1:80
		T3	≥ 1:80			T3	≥ 1:80
	G	T0	≥ 1:80		P	T0	≥ 1:80
		T2	≥ 1:80			T2	≥ 1:80
		T3	≥ 1:80			T3	≥ 1:80
	H	T0	≥ 1:80		Q	T0	≥ 1:80
		T2	≥ 1:80			T2	≥ 1:80
		T3	≥ 1:80			T3	≥ 1:80
<b>Cães com parvovirose</b>	1	ND	< 1:80				
	2	ND	< 1:80				
	3	ND	< 1:80				
	4	ND	< 1:80				
	5	ND	< 1:80				
	6	ND	< 1:80				
	7	ND	< 1:80				
	8	ND	< 1:80				

ND: Não Disponível

**Tabela 19:** Tabela de contingência para a detecção de Ac plasmáticos anti-CPV nos animais do grupo oncológico, do grupo controlo e do grupo da parvovirose

	$\geq 1:80$	$< 1:80$	Total (FA/FR)
<b>Oncológico</b>	23 / 95.8%	1 / 4,2%	24 / 42,85%
<b>Controlo</b>	23 / 95.8%	1 / 4,2%	24 / 42,85%
<b>Parvovirose</b>	0 / 0%	8 / 100%	8 / 14,3%
<b>Total (FA/FR)</b>	46 / 82,14%	10 / 17,86%	56 / 100%

**Figura 6:** Exemplos de reacções de ELISA positivas e negativas

Fig. 6a: Cor azul de intensidade igual ou superior ao controlo positivo, correspondente a ELISAs positivos (título de Ac anti-CPV  $\geq 1:80$ )



Fig. 6b: Cor azul de intensidade inferior ao controlo positivo, correspondente a ELISAs negativos (título de Ac anti-CPV  $< 1:80$ )

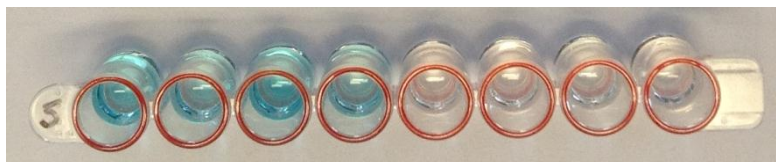


Fig. 6c: Controlos positivo (azul) e negativo (incolor) da reacção de ELISA

