LEDA MARQUES DE OLIVEIRA-BARROS

Avaliação endoscópica de cães portadores de doença inflamatória intestinal crônica: correlação com índices clínicos, laboratoriais e histopatológicos

São Paulo
2012

LEDA MARQUES DE OLIVEIRA-BARROS

Avaliação endoscópica de cães portadores de doença inflamatória intestinal crônica: correlação com índices clínicos, laboratoriais e histopatológicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:
Prof[a]. Dr[a]. Julia Maria Matera

São Paulo
2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2669
FMVZ

Oliveira-Barros, Leda Marques de
Avaliação endoscópica de cães portadores de doença inflamatória intestinal crônica: correlação com índices clínicos, laboratoriais e histopatológicos / Leda Marques de Oliveira-Barros. -- 2012.
119 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Julia Maria Matera.

1 Doença inflamatória intestinal crônica. 2. Endoscopia. 3. Escore clinico. 4. Marcadores inflamatórios. 5. Avaliação histopatológica e laboratorial. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação endoscópica de cães portadores de doença inflamatória intestinal crônica: correlação com índices clínicos, laboratoriais e histopatológicos", protocolado sob o nº 1601/2009, utilizando 20 (vinte) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Júlia Maria Matera, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 18 de março de 2009.

We certify that the Research "Endoscopic evaluation of dogs with intestinal bowel disease: correlations with clinical, laboratorial and histopathological parameters", protocol number 1601/2009, utilizing 20 (twenty) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Júlia Maria Matera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 03/18/09.

São Paulo, 20 de março de 2009

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: OLIVEIRA-BARROS, Leda Marques de

Título: **Avaliação endoscópica de cães portadores de doença inflamatória intestinal crônica:** correlação com índices clínicos, laboratoriais e histopatológicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data:____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Julgamento:_____

Ao Luiz Felipe, porque o amo mais que tudo. Por ser uma pessoa incrível e o melhor marido do mundo. Por tanto companheirismo, amizade, apoio, incentivo, dedicação, participação, paciência e amor.

Aos meus pais Roberto e Silvia, por serem tão especiais e terem dedicado suas vidas à minha formação.

Às minhas irmãs Fernanda e Beatriz, meus cunhados Wolmar, Nilton e Kika, meus sobrinhos Anna Carolina e André, meus avós, tios e primos por serem meu porto-seguro, o alicerce da minha vida e sempre acreditarem na minha capacidade.

Aos meus sogros Silvia e Paulo Sérgio, pelo incentivo acadêmico e profissional.

Ao Thunder e à Condolessa, amigos fiéis e leais

"*Nenhum caminho é longo demais quando estamos com quem amamos*"
(provérbio chinês)

AGRADECIMENTOS

À Profª. Drª. Julia Maria Matera, pela orientação, confiança e liberdade para que eu percorresse este caminho novo.

À Fernanda Auler, pela amizade, grande parceria e pela imensa ajuda na endoscopia.

Aos amigos de pós-graduação pela companhia valiosa e por dividirem momentos tão especiais.

Ao Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias por ser um amigo tão especial e presente; e por participar de forma tão importante na tese e na minha vida. Por transformar as leituras de lâminas em momentos extremamente agradáveis, de muito aprendizado, conversa e planejamento de viagens.

Ao Prof. Dr. Heidge Fukumasu, pela amizade e por participar do projeto com tanta dedicação e disponibilidade.

Às médicas veterinárias do Serviço de Cirurgia, do Serviço de Anestesia e do Serviço de Clínica Médica, pelo convívio prazeroso, encaminhamento de casos e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos enfermeiros Lélis, Jesus, Otavio e Miron, com os quais sempre pude contar.

Ao Ney e a Lívia, pelas inúmeras ajudas e favores.

Às bibliotecárias, em especial a Elza, pela formatação da tese.

À Profª. Drª. Solange Gennari, funcionários e pós-graduandos do Laboratório de Doenças Parasitárias pela execução dos exames coproparasitológicos.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela minha formação acadêmica e profissional.

À FAPESP pelo suporte financeiro durante o período do doutorado.

Aos médicos endoscopistas e enfermeiras do Hospital Universitário da USP por tanta receptividade, incentivo e ensinamentos endoscópicos, fazendo com que meu estágio fosse extremamente prazeiroso e repleto de aprendizado.

Ao GILab - Texas A&M University, em especial à Romy Heilmann, por terem me recebido tão bem e por participarem deste projeto.

Aos proprietários e aos animais que participaram deste estudo, meus sinceros agradecimentos e respeito.

À todas as outras pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho.

RESUMO

OLIVEIRA-BARROS, L. M. **Avaliação endoscópica de cães portadores de doença inflamatória intestinal crônica:** correlação com índices clínicos, laboratoriais e histopatológicos. [Endoscopic evaluation of dogs with inflammatory bowel disease: correlation with clinical, laboratory and histopathological scores]. 2012. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O objetivo do presente trabalho foi diagnosticar a doença inflamatória intestinal crônica em cães acometidos por sinais gastrointestinais bem como avaliar a contribuição de diferentes parâmetros utilizados no diagnóstico desta afecção. Para tanto, 20 cães apresentando sinais compatíveis com a doença foram incluídos no estudo (grupo afetado) e comparados com 20 animais saudáveis (grupo controle). Foram atribuídos escores clínicos e realizadas avaliações endoscópicas e histopatológicas dos animais do grupo afetado. Amostras de sangue e fezes de ambos os grupos foram coletadas, armazenadas a -80°C e, posteriormente, utilizadas para a mensuração de TNF-alpha, proteína C-reativa, calprotectina, proteína S100A12, Folato e Cobalamina. A mediana dos valores de albumina sérica foi 3,17 e apenas um animal apresentou hipoalbuminemia. Todas as avaliações endoscópicas mostraram algum grau de alteração nos parâmetros avaliados, sendo que o edema e a hiperemia foram os mais observados. Quanto à avaliação histopatológica, processos do tipo linfocítico plasmocítico foram os mais diagnosticados, presentes em 12 dos 17 acometimentos gástricos, nove dos 15 acometimentos duodenais e nove de 11 acometimentos colônicos. Quando se analisam os escores atribuídos aos parâmetros gástricos, 67,3% das avaliações foram consideradas normais, enquanto que 27,4% foram considerados com alterações leves. Para os fragmentos duodenais, 55,3% das avaliações demonstraram tecidos normais enquanto que 36,0% foram considerados com alterações leves. No que se refere ao cólon, apenas 38,6% dos parâmetros avaliados foram normais enquanto que 45,4% receberam avaliações de alterações leves. As medianas dos escores atribuídos para estômago, duodeno e cólon foram, respectivamente, 3; 3 e 6. A comparação entre valores de proteína C-reativa entre grupo afetado e controle apresentou diferença estatisticamente significante. Esta diferença também foi significante quando se comparou o grupo

controle aos subgrupos afetado I e afetado II. Embora valores séricos de calprotectina não foram estatisticamente significantes, a mensuração fecal desta proteína foi mostrou diferença significante entre os grupos. Em relação mensuração sanguínea da proteína S100A12, os valores de medianas de ambos os grupos foram próximos (195,90 µg/L e 195,55 µg/L para grupos afetado e controle, respectivamente) e a comparação entre estes valores não foi estatisticamente significante. Esta diferença também não foi significante na comparação dos valores fecais. Mensurações de folato e cobalamina não se mostraram estatisticamente significante na comparação entre animais afetados e sadios. Observaram-se correlações entre valores de proteína C-reativa e escore clínico, proteína C reativa e escore histopatológico do cólon, albumina e calprotectina fecal, albumina e S100A12 fecal, valores séricos de S100A12 e calprotectina, valores fecais de S100A12 e calprotectina.

Palavras-chave: Doença inflamatória intestinal crônica. Endoscopia. Escore clínico. Marcadores inflamatórios. Avaliação histopatológica e laboratorial.

ABSTRACT

OLIVEIRA-BARROS, L. M. **Endoscopic evaluation of dogs with inflammatory bowel disease: correlation with clinical, laboratory and histopathological scores** [Avaliação endoscópica de cães portadores de doença inflamatória intestinal crônica: correlação com índices clínicos, laboratoriais e histopatológicos]. 2012. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The purpose of this study was to diagnose inflammatory bowel disease in dogs with gastrointestinal signs as well as to evaluate the contribution of different parameters used in the diagnosis of this disease. Twenty dogs with compatible signs of the disease were included in the study (affected group) and compared with 20 healthy animals (control group). Clinical scores were assigned and endoscopic and histopathological analysis were performed in affected animals. Samples of blood and feces were collected from both groups, stored at -80°C and then used to measure TNF-alpha, C-reactive protein, calprotectin, S100A12 protein, folate and cobalamin. Seric albumin median level was 3.17g/dL and only one animal had hypoalbuminemia. All endoscopic evaluations showed some degree of change in the assessed parameters, and hyperemia and edema were the most frequently ones observed. In the histopathological evaluation, lymphocytic plasmocytic process was the most frequently diagnosed (12 out 17 gastric conditions, nine out 15 duodenal conditions and nine out 11 colonic conditions). When analyzing the scores assigned to the gastric parameters, 67.3% of the evaluations were considered normal, while 27.4% presented slight alterations. For duodenal fragments, 55.3% of the evaluations showed normal tissue, while 36.0% were considered slightly altered. Regarding the colon, only 38.6% of these parameters were normal, whereas 45.4% of the evaluations presented slight changes. The median of the scores assigned to the stomach, duodenum and colon were 3, 3 and 6, respectively. The comparison of the C-reactive protein values between affected and control groups showed statistical difference. This difference was also significant when comparing the control group to affected I and affected II subgroups. Although seric values of calprotectin weren't statistically significant, fecal data statistically differed between the groups.

Regarding seric protein S100A12 measurement, the median values of both groups were similar (195.90 mg/L and 195.55 mg/L for the affected and control groups, respectively) and the difference between these values was not statistically significant. The comparison between fecal S100A12 protein values didn’t showed a significant difference. Folate and cobalamin measurements showed no statistical difference when comparing healthy and affected animals. A direct positive correlation was found between C-reactive protein and clinical score. C-reactive protein and histopathological score of colon, albumin and fecal calprotectin, albumin and fecal protein S100A12, seric protein S100A12 and seric calprotetin and fecal protein S100A12 and fecal calprotectin were correlated.

Keywords: Inflammatory bowel disease. Endoscopy. Clinical scores. Inflammatory Markers Histopathological and laboratory evaluation

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

B12	cobalamina
CD	*cluster of differentiation*
Dr.	doutor
DIIC	doença inflamatória intestinal crônica
EGD	esofagogastroduodenoscopia
ELISA	enzyme-linked immunoabsorbent assay
F	fêmea
FA	fosfatase alcalina
FI	fator intrínseco
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
FZEA/USP	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo
GI Lab	Gastrointestinal Laboratory – Texas A&M University
Ht	hematócrito
IC	intervalo de confiança
IFN-γ	interferon gamma
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
IRC	insuficiência renal crônica
K	potássio
LMMD	Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento
M	macho
n	número de amostras
NEG	negativo
NF-κB	fator nuclear ƙappa beta
Nk	*natural killer*
p	valor de p; nível descritivo
PCR	polymerase chain reaction – reação em cadeia da polimerase
PFA	proteína de fase aguda
POS	positivo
Prof.	professor

PRR	*pattern recognition receptor* – receptores de padrão de reconhecimento
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
cm	centímetro
µl	microlitro
µm	micrômetro
mg	miligramas
ml	mililitro
mm	milímetro
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
spp	espécie
SRD	sem raça definida
^{99}Tc	*technetium* 99
TGE	transição esofagogástrica
TGF-B	*transforming grownt factor beta*
TGI	trato gastrointestinal
TLR	*toll-like Receptors*
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
VPS	Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal
VPT	Departamento de Patologia
WSAVA	*World Small Animal Veterinary Association*
%	porcentagem
α	alfa
°C	graus Celsius
kDa	kilodalton

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Grafico 1 – Representação gráfica da distribuição racial dos pacientes - FMVZ/USP – São Paulo, 2012..... 52
Grafico 2 – Representação gráfica da distribuição do escore endoscópico nos diferentes segmentos avaliados - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 60
Grafico 3 – Representação gráfica do valor de mediana em cada grupo, nos diferentes segmentos avaliados - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 63
Grafico 4 – Representação gráfica da distribuição do grau de alteração histopatológica dos fragmentos de mucosa gástrica dos cães acometidos – FMVZ/USP – São Paulo, 2012..... 70
Grafico 5 – Representação gráfica da distribuição do grau de alteração histopatológica dos fragmentos de mucosa duodenal dos cães acometidos – FMVZ/USP – São Paulo, 2012..... 72
Grafico 6 – Representação gráfica da distribuição do grau de alteração histopatológica dos fragmentos de mucosa colônica dos cães acometidos – FMVZ/USP – São Paulo, 2012..... 74
Grafico 7 – Representação gráfica dos valores de proteína C reativa nos grupos afetado e controle - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 77
Grafico 8 – Representação gráfica dos valores de proteína C reativa nos sub-grupos - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 78
Grafico 9 – Representação gráfica dos valores de calprotectina sérica nos grupos afetado e controle - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 79
Grafico 10 – Representação gráfica dos valores de calprotectina sérica nos subgrupos - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 80
Grafico 11 – Representação gráfica dos valores de calprotectina fecal nos grupos afetado e controle - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 81
Grafico 12 – Representação gráfica dos valores de calprotectina fecal nos subgrupos - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 82
Grafico 13 – Representação gráfica dos valores de proteína S100A12 nos grupos afetado e controle - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 83
Grafico 14 – Representação gráfica dos valores de proteína S100A12 nos subgrupos - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 84
Grafico 15 – Representação gráfica dos valores fecais de proteína S100A12 nos grupos afetado e controle - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 85
Grafico 16 – Representação gráfica dos valores fecais de proteína S100A12 nos subgrupos - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 86
Grafico 17 – Representação gráfica dos valores de folato nos grupos afetado e controle - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 87
Grafico 18 – Representação gráfica dos valores de cobalamina nos grupos afetado e controle - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 88
Grafico 19 – Representação gráfica dos valores de folato nos subgrupos - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 89
Grafico 20 – Representação gráfica dos valores de cobalamina nos subgrupos - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 90
Figura 1 – Critério de determinação de índice de atividade da doença inflamatória intestinal crônica em cães (adaptado de Jergens et al. 2003) - FMVZ/USP – São Paulo..... 31
Figura 2 – Imagens endoscópicas dos animais afetados incluídos no estudo. (A)

esôfago normal, (B)estrias erosivas longitudinais em terço distal de esôfago, (C) leve edema e hiperemia em corpo gástrico, (D) e (E) pregas gástricas e canal antral, (F) hiperemia puntiforme múltiplas em canal antral, (G) ulcerações em corpo gástrico..... 58
Figura 3 – Imagens endoscópicas dos animais afetados incluídos no estudo. (A) canal antral e piloro, (B) duodeno e papila duodenal, (C) leve edema e hiperemia em duodeno, (D) granulosidade e irregularidade de duodeno, (E) hiperemia em íleo, (F) edema e hiperemia em cólon, (G) intenso edema, hiperemia, irregularidade e friabilidade de cólon..... 59
Figura 4 – Fotomicrografia de corte histológico de estômago do cão n°13..... 64
Figura 5 – Fotomicrografia de corte histológico de estômago do cão n° 20..... 64
Figura 6 – Fotomicrografia de corte histológico de estômago do cão n° 20..... 64
Figura 7 – Fotomicrografia de corte histológico de estômago do cão n° 7..... 64
Figura 8 – Fotomicrografia de corte histológico de estômago do cão n° 19..... 65
Figura 9 – Fotomicrografia de corte histológico de duodeno do cão n° 2..... 65
Figura 10 – Fotomicrografia de corte histológico de duodeno do cão n° 2..... 65
Figura 11 – Fotomicrografia de corte histológico de duodeno do cão n° 13..... 65
Figura 12 – Fotomicrografia de corte histológico de duodeno do cão n° 19..... 66
Figura 13 – Fotomicrografia de corte histológico de duodeno do cão n° 15..... 66
Figura 14 – Fotomicrografia de corte histológico de duodeno do cão n° 15..... 66
Figura 15 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n° 5..... 66
Figura 16 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n° 5..... 67
Figura 17 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n° 13..... 67
Figura 18 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n° 13. 67
Figura 19 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n° 15..... 67
Figura 20 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n° 5..... 68
Figura 21 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n° 8..... 68
Figura 22 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n° 8..... 68
Figura 23 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n° 8..... 68

Figura 24 – Imagem endoscópica e fotomicrografia de corte histológico de estômago do animal n° 16..... 94
Figura 25 – Imagem endoscópica e fotomicrografia de corte histológico de duodeno do animal n° 16.....
94
Figura 26 – Imagem endoscópica e fotomicrografia de corte histológico de duodeno do animal n° 5..... 94
Figura 27 – Imagem endoscópica e fotomicrografia de corte histológico de estômago do animal n° 10..... 95
Figura 28 – Imagem endoscópica e fotomicrografia de corte histológico de duodeno do animal n° 15..... 95
Figura 29 – Imagem endoscópica e fotomicrografia de corte histológico de cólon do animal n° 15..... 95
Quadro 1 – Descrição da padronização dos parâmetros avaliados durante esofagogastroduodenoscopia - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 45
Quadro 2 – Descrição da padronização dos parâmetros avaliados durante colonoscopia - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 46
Quadro 3 – Descrição da padronização dos parâmetros histológicos avaliados para os diferentes segmentos gastrointestinais - FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 48
Quadro 4 – Distribuição dos dados epidemiológicos, escore e sinais clínicos dos pacientes - FMVZ/USP – São Paulo, 2012..... 52
Quadro 5 – Descrição dos parâmetros clínicos e ultrassonográficos dos pacientes - FMVZ/USP – São Paulo, 2012..... 54
Quadro 6 – Descrição dos parâmetros endoscópicos dos pacientes - FMVZ/USP – São Paulo, 2012..... 57
Quadro 7 – Descrição dos escores endoscópicos atribuídos aos animais do grupo afetado - FMVZ/USP – São Paulo, 2012..... 60
Quadro 8 – Descrição dos parâmetros histopatológicos de fragmentos gástricos dos animais do grupo afetado – FMVZ/USP – São Paulo, 2012..... 69
Quadro 9 – Descrição dos parâmetros histopatológicos de fragmentos duodenais dos animais do grupo afetado – FMVZ/USP – São Paulo, 2012..... 71
Quadro 10 – Descrição dos parâmetros histopatológicos de fragmentos colônicos dos animais do grupo afetado – FMVZ/USP – São Paulo, 2012..... 73
Quadro 11 – Descrição dos parâmetros histopatológicos de fragmentos de íleo dos animais do grupo afetado – FMVZ/USP – São Paulo, 2012..... 75
Quadro 12 – Descrição dos escores endoscópicos e histopatológicos dos animais do grupo afetado – FMVZ/USP - São Paulo, 2012..... 92
Quadro 13 – Correlações entre as variáveis analisadas – FMVZ/USP - São Paulo, 2012..... 93
Apendice A- Descrição da avaliação histopatológica inicial dos animais afetados – FMVZ/USP – São Paulo, 2012..... 116
Apendice B- Descrição dos valores séricos individuais de proteína C reativa – FMVZ/USP – São Paulo, 2012..... 117
Apendice C- Descrição dos valores séricos individuais da proteína S100A12 - FMVZ/USP – São Paulo, 2012..... 117
Apendice D- Descrição dos valores fecais médios da proteína S100A12 para cada cão do grupo afetado - FMVZ/USP – São Paulo, 2012..... 118
Apendice E- Descrição de valores séricos individuais de folato e cobalamina - FMVZ/USP – São Paulo, 2012..... 119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Distribuição do grau de alteração histopatológica dos fragmentos de mucosa gástrica dos cães acometidos – FMVZ/USP – São Paulo – 2012 70
Tabela 2 –Distribuição do grau de alteração histopatológica dos fragmentos de mucosa duodenal dos cães acometidos – FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 72
Tabela 3 –Distribuição do grau de alteração histopatológica dos fragmentos de mucosa colônica dos cães acometidos – FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 74
Tabela 4 –Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores de proteína C-reativa – FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 76
Tabela 5 –Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores de proteína C-reativa por subgrupo – FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 77
Tabela 6 –Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores séricos da calprotectina – FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 79
Tabela 7 –Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores séricos da calprotectina por subgrupo – FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 80
Tabela 8 –Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores fecais da calprotectina – FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 81
Tabela 9 –Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores fecais da calprotectina por subgrupo – FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 82
Tabela 10 –Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores séricos da proteína S100A12 – FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 83
Tabela 11 –Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores séricos da proteína S100A12 por subgrupo – FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 84
Tabela 12 –Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores fecais da proteína S100A12 – FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 85
Tabela 13 –Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores fecais da proteína S100A12 por subgrupo – FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 86
Tabela 14 –Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores de folato – FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 87
Tabela 15 –Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores de cobalamina – FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 88
Tabela 16 –Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores de folato por subgrupo – FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 89
Tabela 17 –Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores de cobalamina por subgrupo – FMVZ/USP – São Paulo – 2012..... 90

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO.....20**

2 **REVISÃO DE LITERATURA.....21**

2.1. **Doença inflamatória intestinal crônica** 21

2.2. **Fisiologia da doença inflamatória intestinal crônica** 22

2.3. **Apresentação clínica da afecção.....27**

2.4. **Diagnóstico da doença inflamatória intestinal crônica.....28**

2.5. **Marcadores laboratoriais da doença inflamatória intestinal crônica.....32**

2.5.1. Fator de necrose tumoral (TNF-α) 33

2.5.2. Proteína C-reativa.....33

2.5.3. Calprotectina.....34

2.5.4. Proteína S100A12.....36

2.5.5. Folato e Cobalamina.....37

2.5.6. Marcadores laboratoriais na doença inflamatória intestinal crônica em pequenos animais 39

3 **OBJETIVO 41**

4 **MATERIAL E MÉTODO 42**

4.1 **Seleção dos animais 42**

4.1.1 Grupo afetado.....42

4.1.2 Grupo controle.....42

4.2 **Colheita das amostras fecais e sanguíneas 43**

4.3 **Estabelecimento do escore clínico de atividade da doença inflamatória intestinal crônica 43**

4.4 **Avaliação endoscópica dos animais.....44**

4.5 **Avaliação histopatológica dos fragmentos de biópsias endoscópicas .46**

4.6 **Processamento laboratorial 48**

4.6.1 Fator de necrose tumoral (TNF_α) 48

4.6.2 Proteína C-reativa 49
4.6.3 Calprotectina 49
4.6.4 Proteína S100A12 49
4.6.5 Folato e Cobalamina 50
4.7 **Análise Estatística** 50
5 **RESULTADOS** **51**
5.1 **Parâmetros epidemiológicos** **51**
5.2 **Escore clínico de atividade da doença inflamatória intestinal crônica** **55**
5.3 **Avaliação endoscópica dos animais** **55**
5.4 **Avaliação histopatológica das biópsias endoscópicas** **61**
5.4.1 Avaliação histopatológica inicial 61
5.4.2 Avaliação histopatológica segundo padronização da WSAVA 61
5.5 **Processamento laboratorial** **76**
5.5.1 Fator de necrose tumoral (TNF-α) 76
5.5.2 Proteína C-reativa 76
5.5.3 Calprotectina 78
5.5.3.1 Calprotectina sérica 78
5.5.3.2 Calprotectina fecal 80
5.5.4 Proteína S100A12 83
5.5.4.1 Proteína S100A12 sérica 83
5.5.4.2 Proteína S100A12 fecal 85
5.5.5 Folato e Cobalamina 87
5.6 **Correlação entre as variáveis analisadas** 91
6 DISCUSSÃO **96**
7 CONCLUSÃO **108**
REFERÊNCIAS **109**
APÊNDICE **116**

1. INTRODUÇÃO

Discutida como uma das principais causas de vômito e diarréia crônicos em cães, a doença inflamatória intestinal crônica (DIIC) tem suscitado o interesse médico veterinário acompanhando o crescente avanço na medicina humana. A natureza cíclica e os sintomas inespecíficos relacionados à doença transforma o seu diagnóstico em um grande desafio. Atualmente, o diagnóstico baseia-se na presença de sinais e sintomas compatíveis associados a confirmação histopatológica da inflamação no trato gastrointestinal. A criação recente de padrões histopatológicos nas afecções intestinais inflamatórias na medicina veterinária contribuiu não só no avanço do diagnóstico como também na universalidade do estudo da doença (DAY et al., 2008), evitando-se assim, a ocorrência de subjetividades no diagnóstico histológico. Métodos auxiliares menos invasivos têm sido propostos como auxílio diagnóstico como o índices clínicos de atividade da doença criados por Jergens e colaboradores em 2003 e mensurações de marcadores biológicos como a calprotectina, fator de necrose tumoral e proteína C reativa (SOLEM et al., 2005; VERMEIRE; VAN ASSCHE; RUTGEERTS, 2006; BERGHOFF; STEINER, 2011). Além de úteis para a identificação da afecção, são importantes indicadores da eficácia do tratamento instituído bem como da evolução da doença, fundamental para a definição do prognóstico de cada paciente.

Em todo o mundo, diversos grupos de pesquisa vêm focando seus estudos nesta afecção, dentre eles, os comandados por Albert E. Jergens (Iowa, EUA); Jorg Steiner, Jan Suchodolski e Michael Willard (Texas, EUA), Fogle e Bisset (Carolina do Norte, EUA), Frederic Gaschen (Louisiana, USA) e Karin Allenspach (Reino Unido). No Brasil, não existem relatos de pesquisas direcionadas à DIIC em cães até o presente momento. O aparente envolvimento genético no desenvolvimento desta afecção leva a um interesse de inter-relação entre os grupos de pesquisa mundialmente dispersos, uma vez que dados de diferentes regiões podem auxiliar no entendimento de fatores relacionados a fisiopatologia ainda pouco compreendidos. O intuito deste projeto foi contribuir na definição de parâmetros que devam ser utilizados no diagnóstico de DIIC, assim como definir correlações entre estas possibilidades diagnósticas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença inflamatória intestinal crônica

O termo doença inflamatória intestinal crônica (DIIC) é aplicado na medicina veterinária a inflamações idiopáticas crônicas e intermitentes que acometem uma ou mais áreas do trato gastrointestinal (GUNAWARDANA et al., 1997; JERGENS, 2002; SIMPSON; JERGENS, 2011). É considerado um grupo complexo de desordens intestinal que possuem sinais clínicos persistentes ou intermitentes associados à evidência histológica de infiltrados inflamatórios na lâmina própria do segmento acometido e baixa resposta ao tratamento—(JERGENS, 2002; CAVE, 2003; JERGENS et al., 2003; CERQUETELLA et al., 2010; LUCKSCHANDER et al., 2010). Atualmente, acredita-se que seja uma das principais causas de vômitos e diarréia crônicos em cães e gatos (TAMS, 2005).

Antes da metade dos anos 80, havia pouca informação na literatura veterinária relacionada às doenças inflamatórias intestinais, apenas com relatos de observações clínicas relacionadas a síndrome de má absorção em gatos em 1969 e colite ulcerativa em 1972. O avanço na capacidade de reconhecimento da doença associada ao crescente uso da endoscopia tem possibilitado seu maior entendimento, embora muitos pontos ainda permaneçam obscuros, o que foi traduzido em maior quantidade de estudos e publicações a respeito deste grupo de afecções.

Em humanos, a DIIC é considerada uma doença multifatorial idiopática crônica e é composta por duas entidades: colite ulcerativa e Doença de Crohn. Por se tratarem de enfermidades freqüentes e comprometedoras da qualidade de vida do paciente, têm sido extensamente estudadas (CANANI et al., 2008). A doença de Crohn acomete tipicamente, porém não unicamente, o íleo e o cólon. Tem a capacidade de formar granulomas e envolver toda a parede intestinal. A colite ulcerativa, por sua vez, é uma doença ulcerativa e inflamatória restrita exclusivamente a camadas superficiais (mucosa e porção superficial de submucosa) do cólon (CERQUETELLA et al., 2010).

Em cães, não existem predisposições etárias e sexuais claramente descritas. Embora nem todos os autores descrevam predisposição racial, animais com raças definidas são mais representados na literatura (GUNAWARDANA et al., 1997; FOGLE; BISSETT, 2007). Sabe-se que alguns tipos específicos de enteropatias crônicas são associados a determinadas raças como a enteropatia imunoproliferativa dos Basenjis e colite ulcerativa histiocítica dos Boxers (CERQUETELLA et al., 2010; SIMPSON; JERGENS, 2011). As gastrites, enterites e/ou colites são classificadas dependendo do tipo celular predominantemente envolvido e o local de envolvimento (CERQUETELLA et al., 2010). Os tipos mais comuns de DIIC são a enterite e colite do tipo linfocítico-plasmocítica. Raramente são identificadas enterites puramente linfocíticas. Enterites eosinofílicas e granulomatosas são descritas, porém pouco freqüentes (CRAVEN et al. 2004; TAMS, 2005). A faixa etária acometida pela afecção é bastante variável. Em estudo retrospectivo realizado por Craven et al. (2004), os animais selecionados apresentavam idade entre seis meses e 14 anos, com valor médio de 4,3 anos.

2.2 Fisiopatologia da doença inflamatória intestinal crônica

Trata-se de uma afecção ainda parcialmente compreendida, na qual deve se considerar um processo inflamatório descontrolado em resposta a fatores ambientais, imunoregulatórios e genéticos (FOGLE; BISSETT, 2007; JANECZKO et al. 2008; SIMPSON; JERGENS, 2011). Esta interação de fatores desencadeia uma cascata de eventos que culmina com danos teciduais (KAISER et al., 2007).

É relatada a existência de uma desregulação da imunidade normal da mucosa gastrointestinal com perda da tolerância à microbiota intestinal e constituintes da dieta com subseqüentes respostas atípicas a estes antígenos em indivíduos geneticamente predispostos (CAVE 2003; XENOULIS et al., 2008; CERQUETELLA et al., 2010; LUCKSCHANDER et al., 2010). Craven et al. (2004) acreditam que fatores genéticos possam modular e perpetuar a DIIC.

A principal anormalidade que define DIIC é o infiltrado inflamatório na lâmina própria predominantemente composto por linfócitos B e T e células plasmáticas (CAVE, 2003). O intestino delgado, especialmente o duodeno, é mais comumente

acometido quando comparado ao cólon, o que difere este afecção das observadas em humanos, nas quais raramente esta porção intestinal está envolvida (CAVE, 2003; LUCKSCHANDER et al., 2010).

Em tratos intestinais saudáveis, o sistema imune local garante um balanço entre mediadores anti e pró-inflamatórios. Desta forma, permite-se uma defesa eficaz contra patógenos luminais além da ausência de reação imunológica exacerbada contra bactérias inofensivas e antígenos alimentares. Esta dita tolerância imunológica é fundamental para a manutenção da homeostase do trato digestivo (CERQUETELLA et al., 2010; LUCKSCHANDER et al., 2010).

Citocinas participam da modulação do sistema imune. Para a manutenção da homeostase, o sistema imune da mucosa normal equilibra a relação entre mediadores inflamatórios como pro-inflamatórios, anti-inflamatórios e citocinas regulatórias. Citocinas são sintetizadas rapidamente e secretadas após estimulação e induzem a produção de moléculas de adesão e outros mediadores inflamatórios incluindo espécies reativas de oxigênio, metabólitos do óxido nítrico e produtos lipídicos como prostaglandinas, leucotrienos e fatores de ativação plaquetária (JERGENS et al., 2009).

Durante a inflamação local ou sistêmica em cães, fagócitos com tecidos inflamados produzem diversas citocinas inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral *alpha* (TNF-α) (MCCANN et al., 2007; PALTRINIERI, 2007). Ao atingirem a circulação, estas interleucinas induzem uma seqüência de respostas conhecidas como reação de fase aguda com o objetivo de estimular rápida e intensamente respostas protetoras da homeostase. Para que isto ocorra, diversas proteínas de fase aguda (PFA) estão envolvidas. A maioria destas são denominadas proteínas positivas de fase aguda, pois são sintetizadas pelo fígado e têm sua concentração plasmática aumentada em relação à basal. Em contrapartida, as proteínas negativas de fase aguda apresentam decréscimo da concentração plasmática em processos inflamatórios como os descritos. A modulação da produção destas proteínas depende de uma ação sinérgica das citocinas envolvidas: o TNF-α induz proteólise periférica, o que aumenta o fluxo de aminoácidos no fígado; IL-1 inibe a síntese de PFA negativas e estimula a produção de PFA positivas em colaboração com glicocorticóides, também produzidos em conseqüência de ativação mediada pela IL-1 do eixo adrenal-pituitária; IL-6 está envolvido na liberação de PFA positivas pelos hepatócitos. As PFA positivas incluem

proteínas com atividade imunomodulatória e/ou antimicrobiana (proteína C reativa, frações de complemento com C3 e C4), proteínas transportadoras (como haptoglobinas) e proteínas *scavenger* (*scavenger* = removedor) como o soro amilóide A e α-globulinas. Em cães, a proteina C-reativa é considerada a PFA positiva mais importante uma vez que apresenta aumento mais freqüente e marcante quando comparado às outras. A albumina, principal PFA negativa, é a mais abundante na circulação e sua produção requer grande quantidade de aminoácidos. Desta forma, na presença de reações de fase aguda, sua produção é diminuída com a finalidade de manter maior quantidade de aminoácidos disponíveis (PALTRINIERI, 2007).

Em animais acometidos pela DIIC, tem-se uma desregulação na produção de citocinas e nos mecanismos de sinalização por células epiteliais, linfócitos e macrófagos. Estes últimos, quando ativados, atuam como grandes responsáveis na produção de citocinas intestinais e no recrutamento de monócitos. Esta produção e ativação de citocinas pró-inflamatórias são reguladas por fatores de transcrição, incluindo o fator nuclear ƙ beta (NF- ƙB). Luckschander et al. (2010) observaram aumento significativo de ativação de NF-ƙB em macrófagos e outras células da lâmina própria de mucosa de biópsia de cães acometidos por enteropatias crônicas e sem tratamento prévio quando comparados aos animais controle. Estes autores também relataram uma diminuição desta ativação após o início do tratamento destes animais quando comparado a valores obtidos previamente.

É descrita a expressão de receptores transmembrânicos de padrão de reconhecimento (*pattern recognition receptors* - PRR) tanto em células de corpos vertebrais como em células do sistema imunológico inato, como macrófagos e células dendríticas. Estes receptores contribuem para a defesa do hospedeiro e são capazes de reconhecer diversos microorganismos como bactérias (gram negativas e positivas), fungos, vírus e parasitas, sendo a base da manutenção da tolerância gastrointestinal (CERQUETELLA et al., 2010). A ativação de alguns destes receptores, como *Toll-like Receptors* (TLR), leva a produção de citocinas pró-inflamatórias entre outras sinalizações. Em animais acometidos por DIIC, observa-se significativa elevada expressão de receptores TLR do tipo 2, 4 e 9, que estão estritamente relacionados com a expressão de bactérias (BURGENER et al., 2008). O grau de expressão destes receptores não foi alterado após a instituição de tratamento específico. Desta forma, estes autores mostraram a desregulação entre

sistema imune do hospedeiro e microbiota intestinal na patogênese da DIIC bem como sugeriram a presença de predisposição genética em cães semelhante ao aceito na medicina.

Baseado no perfil de secreção de citocinas, linfócitos T-*helper* CD4+ podem ser divididos em populações Th1 e Th2 sendo que o primeiro tipo está relacionado a respostas resultando em imunidade celular enquanto que Th2 está relacionada a repostas por ativação de células B e respostas imunes humorais (RIDYARD et al., 2002). Em humanos, observam-se diferentes envolvimentos dos subtipos de linfócitos Th1 e Th2 na DIIC sendo que respostas Th1 estão mais relacionadas à doença de Crohn enquanto que a retocolite ulcerativa apresenta predominância de Th2. Esta diferença entre tipos de linfócitos implica em diferentes ativações de citocinas. Diferentemente dos humanos, em cães observa-se uma ativação mista de Th1 e Th2, levando a expressão de grande número de citocinas. Alguns autores acreditam que, mesmo apresentando uma resposta mista, é possível observarmos padrões específicos de células Th para cada tipo de DIIC. O número de mastócitos pode estar aumentado ou diminuído, dependendo do infiltrado celular predominante; em quadros de enterites linfocíticas plasmocíticas observa-se redução do número de mastócitos enquanto que em quadros de gastroenterites, este tipo celular apresenta-se aumentado. Desta forma, enterites linfocíticas plasmocíticas estariam mais relacionadas a respostas tipo Th1 enquanto que gastroenterites eosinofílicas estariam mais associados a respostas Th2 (CERQUETELLA et al., 2010).

Jergens et al. (2009) descrevem a limitação de dados que avaliem o papel do linfócito T CD4+ e citocinas na patogenia da DIIC em cães. Enquanto German et al. (2000) observaram aumento do número destes linfócitos, Jergens et al. (1999) notaram diminuição em cães com acometimento de intestino delgado. Em animais com colite relacionada à DIIC, verificou-se elevação do número de linfócitos CD4+ (30,49). German et al. (2001) mensuraram a expressão de diversas citocinas e mostraram a relação substâncias pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Entretanto, estes autores utilizaram apenas quatro animais. Craven et al. (2004) observaram deficiência na ativação de citocinas relacionadas aos linfócitos T-*helper* CD4+, fatores de necrose tumoral e interleucinas, especialmente a do tipo 12 em pacientes acometidos por DIIC. Estes CD4+ apresentam diversos efeitos na produção de citocinas, que, por sua vez, regulam a homeostase da mucosa gastrointestinal (GERMAN et al., 2000).

O aumento de células produtoras de imunoglobulinas IgA, IgE e IgG também está relacionado ao quadro (FOGLE; BISSETT, 2007; CERQUETELLA et al., 2010) porém a produção aberrante ou deficitária destas imunoglobulinas pode estar presente (GERMAN et al., 2000). O aumento de IgE sugere o envolvimento de reações de hipersensibilidade a patogenia da afecção (CERQUETELLA et al., 2010).

Em humanos, o local da lesão apresenta significante relação com o prognóstico da doença, o que ainda não foi estabelecido em animais. Da mesma forma, desconhece-se na veterinária a associação entre DIIC e o desenvolvimento de neoplasia, o que é amplamente estabelecido na medicina (CRAVEN et al., 2004).

Em felinos, Janeczko et al. (2008) observaram relação entre microbiota intestinal, achados histopatológicos, quantificação de citocinas e sinais clínicos. Neste estudo, o número de enterobactérias obtidas em biopsias duodenais foi superior em gatos com sinais de DIIC em relação a animais saudáveis. Da mesma forma, animais acometidos apresentaram maiores alterações histopatológicas, incluindo infiltrado inflamatório, erosão epitelial, fusão e atrofia de vilos, hiperplasia criptal e fibrose, além de maior quantidade de citocinas (especialmente IL 1, 8 e 12) e sinais clínicos exacerbados. Para as análises histopatológicas, foram utilizadas biopsias provenientes de procedimentos endoscópicos.

Xenoulis et al. (2008) compararam populações microbianas do intestino delgado em cães afetados pela DIIC e cães normais através de técnicas de PCR. Animais doentes apresentaram um desbalanço nestas populações, com marcante aumento do número de indivíduos das famílias *Enterobacteriaceae* e *Clostridiaceae,* sendo que o número de indivíduos desta última família apresentou correlação significativa com severidade histológica e escore clínico da afecção. Desta forma, este estudo corrobora a participação da microbiota intestinal no desenvolvimento da DIIC.

A manipulação desta microbiota tanto através do uso de antibióticos como de probióticos acaba por funcionar como estratégia terapêutica para pacientes portadores de DIIC (XENOULIS et al., 2008; JERGENS et al., 2010).

2.3 Apresentação clínica da afecção

Um dos sinais clínicos mais observados em pacientes com DIIC é o vômito. Normalmente apresenta curso intermitente por semanas, meses ou anos. Quase sempre, com a evolução da doença, este sintoma torna-se mais freqüente. Concomitantemente, tem-se o surgimento de novos sinais, o que acaba por gerar procura por atendimento veterinário. Os episódios eméticos são associados à ânsia, não saem em jato e podem ser de coloração clara, biliar ou espumoso. Podem ser observados vômitos de conteúdo alimentar fresco ou parcialmente digerido. Raramente nota-se hematêmese, porém quando presente, pode indicar envolvimento gástrico concomitante ou a presença de erosões superficiais no intestino delgado.

Quadros diarréicos também são freqüentemente observados na DIIC, associados ou não a outros sintomas. Podem ser agudos ou crônicos, e parcialmente responsivos a tratamentos sintomáticos inespecíficos e alterações de dieta (JERGENS, 2004). Em alguns casos, este sintoma pode permanecer quiescente até a ocorrência de um evento estressante, como mudança de ambiente ou trabalho de parto. A localização da região responsável pela ocorrência da diarréia é importante para a condução do caso, pois definirá quais exames complementares serão adequados para o diagnóstico. A disquesia também pode ser observada em alguns casos.

Além de vômito e diarréia, alterações de atitude ou atividade, alterações de apetite (disorexia, anorexia ou voracidade) e perda de peso são descritos (CERQUETELLA et al., 2010).

A natureza cíclica e a falta de especificidade dos sintomas relacionados à DIIC acaba por dificultar seu diagnóstico uma vez que podem desaparecer espontaneamente (JERGENS, 2004; MCCANN et al., 2007). Isto indica que um quadro não tratado apresenta uma evolução freqüentemente caracterizada por exacerbações e remissões. Neste sentido, deve-se atentar para o equívoco no diagnóstico clínico de remissão e controle da doença. As avaliações endoscópicas e histopatológicas da mucosa intestinal são fundamentais na definição do tratamento e sucesso terapêutico dos animais (CRAVEN et al., 2004).

2.4 Diagnóstico da doença inflamatória intestinal crônica

O diagnóstico definitivo da DIIC só pode ser obtido através da análise histopatológica de amostras de biopsias, associada à exclusão de doenças que mimetizem a apresentação clínica da DIIC (GUNAWARDANA et al., 1997; CAVE, 2003; TAMS, 2005; FOGLE; BISSETT, 2007; CERQUETELLA et al., 2010). Nos cães, giardíase crônica, sensibilidades alimentares, supercrescimento bacteriano, enterotoxicose por *Clostridium perfringens*, linfangiectasia, linfomas, pitiose, doenças intestinais funcionais, histoplasmose, insuficiência pancreática exócrina e adenocarcinomas são diagnósticos diferenciais desta afecção e devem ser descartados (TAMS, 2005; FOGLE; BISSETT, 2007).

Associado a isto deve se atentar para o fato de que a DIIC apresenta manifestações clínicas diversas e freqüentemente intermitentes, o que dificulta seu diagnóstico. Desta forma, a avaliação minuciosa dos animais quanto seu estado geral e possibilidade de outras doenças deve ser realizada com auxílio de exames complementares como as avaliações hematológicas e bioquímicas, urinálise, exames coproparasitológicos, testes sorológicos e avaliações radiográficas e ultrassonográficas. Exames ultrassonográficos são de grande importância na identificação de espessamentos da parede gástrica e/ou intestinal, o que tem sido alvo de estudos que buscam correlacionar esta ferramenta ao curso da doença (CERQUETELLA et al., 2010).

Animais portadores de DIIC podem apresentar anemia não-regenerativa, leucocitose sem desvio á esquerda, eosinofilia, hipoproteinemia, hipoalbuminemia, perda protéica fecal e deficiência de cobalamina. A hipoproteinemia está associada à redução do apetite, síndromes de má-absorção (associada à redução da área de superfície intestinal e a fibrose e atrofia de vilosidades intestinais, hemorragia, exsudação protéica intestinal para o lúmen intestinal), além do aumento de permeabilidade intestinal decorrente do processo inflamatório crônico (CRAVEN et al., 2004). Janeczko et al. (2008) relataram panhipoproteinemia, hipoalbuminemia e hipoglobulinemia nos felinos acometidos pela DIIC.

Para a confirmação do diagnóstico, as biópsias gastrointestinais podem ser realizadas por via endoscópica ou através de laparotomia exploratória. Biópsias endoscópicas são recomendadas pelo fato de se tratar de uma técnica segura,

rápida e menos invasiva, além de possibilitar a avaliação geral da mucosa gastrointestinal (GUNAWARDANA et al., 1997). Este fato é relevante principalmente nos animais que apresentam lesões localizadas, dificultando o sucesso diagnóstico quando por procedimento cirúrgico, uma vez que a localização correta da lesão pode ser prejudicada ou inviável. Como desvantagem, tem-se a limitação quanto a dimensão e profundidade das biópsias por endoscopia, que representam apenas as camadas mucosa e submucosa. Quando da suspeita de lesões profundas, a impossibilidade de avaliação das camadas muscular e serosa do tecido faz com que seja necessária a indicação de colheita de biópsias por laparotomia. Para Tams (2005), esta limitação do procedimento endoscópico não deve ser significante para pacientes com avaliações criteriosas. Para Elwood (2005) e Fefferman e Farrel (2005), a realização de endoscopia associada à coleta de biopsias deve ser considerada *gold standard* na avaliação de inflamação intestinal.

Devem ser obtidas múltiplas amostras de todos os segmentos avaliados, mesmo que macroscopicamente não apresentem lesões severas ou que a sintomatologia não seja diretamente relacionada à porção em questão. Não é incomum que cães e gatos com DIIC somente no intestino delgado apresentem sinais limitados ao vômito crônico intermitente. A qualidade e quantidade de amostras selecionadas são fundamentais para o sucesso diagnóstico. Macroscopicamente, as mucosas de animais com DIIC podem apresentar desde padrão de normalidade até diferentes graus de lesões, com alteração de coloração, presença de irregularidades, fissuras, erosões e tecido friável. Nestes casos, a realização de biópsias pode cursar com maior sangramento ou perda de porções teciduais extensas quando comparado a animais saudáveis.

Não existem dados objetivos a despeito da segurança da realização de biopsias intestinais para pequenos animais durante esofagogastroduodenoscopia (EGD). Os riscos potencialmente passíveis de ocorrer incluem morte anestésica, perfuração gastroduodenal, dilatação e vólvulo gástrico, superdistensão gástrica e transferência de enteropatógenos (ZORAN, 2001). Em humanos, a taxa de complicações maiores é de 0,2% associado a 0,01% de óbitos. Leib, Baechtel e Monroe (2004) descrevem 0,85% de complicações maiores em colonoscopias de 355 cães. O risco de perfuração pela pinça é extremamente baixo e deve ser considerado apenas em biopsias profundas de áreas ulceradas (TAMS, 2005; ELWOOD, 2005).

Nas doenças inflamatórias crônicas, observa-se aumento substancial do número de células inflamatórias na lâmina própria. Estes infiltrados podem ser de um ou mais tipos celulares. Na maior parte dos casos, é observada enterite do tipo linfocítico-plasmocítica. As alterações histológicas são classificadas como leve, moderada e severa, e as porcentagens das células inflamatórias são registradas. Outras anormalidades relatadas incluem atrofia de mucosa, atrofia de vilos sem hiperplasia de criptas, fusão de vilos, erosão epitelial e fibrose (TAMS, 2005).

A existência de erros relacionados ao processo de biopsias é relatada como fator limitante no correto conhecimento da DIIC. Estes erros incluem a coleta de biopsias endoscópicas propriamente (tamanho e qualidade das amostras), armazenamento e processamento do material, bem como sua interpretação microscópica das amostras, considerada subjetiva e completamente individual. A ausência de uniformidade na análise histopatológica prejudicava o diagnóstico da afecção bem como dificultava a comparação entre os resultados de diferentes estudos no assunto (WILLARD et al., 2001; WILLARD et al., 2002; TAMS, 2005).

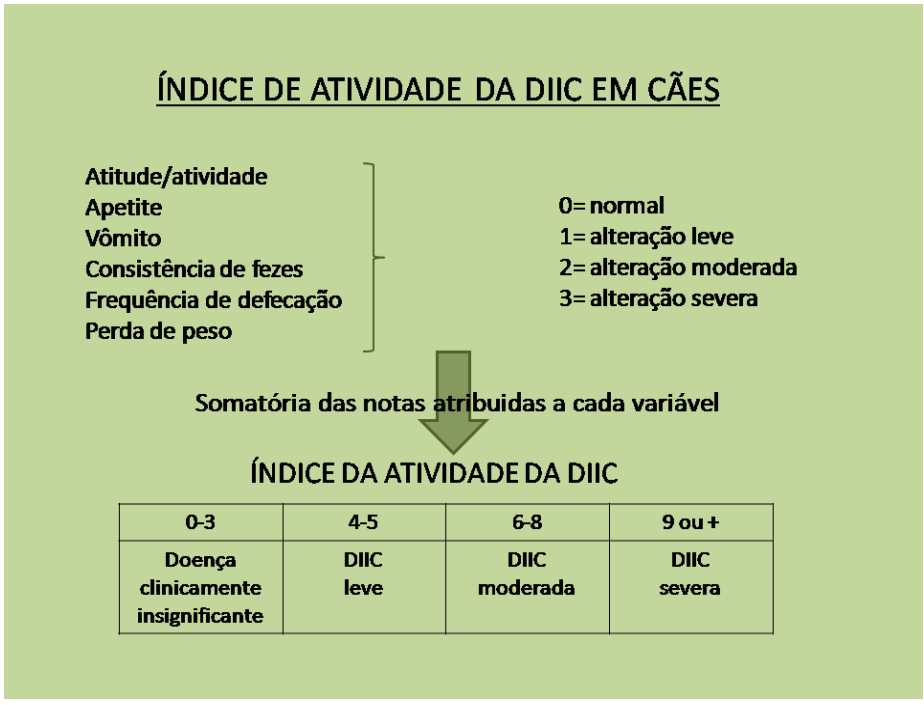
Recentemente, foi publicado pela *World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group (WSAVA)* novos critérios para a avaliação histopatológica de quadros inflamatórios gastrointestinais. Desta forma, buscou-se a padronização de interpretações por parte dos patologistas veterinários. Day et al. (2008) acreditam que a aceitação internacional desta padronização significará um grande avanço no conhecimento da DIIC em pequenos animais.

Diversos métodos auxiliares e objetivos têm sido pesquisados no intuito de contribuir tanto para o diagnóstico como também para o estabelecimento do prognóstico e avaliação do curso da doença. Estas alternativas são buscadas uma vez que procedimentos endoscópicos ou cirúrgicos não são isentos de riscos, apresentam alto custo e necessitam de equipamentos especializados além de anestesia geral (GUNAWARDANA et al., 1997). Além disto, alterações histológicas não são descritas como método adequado de acompanhamento da doença, visto sofrerem alterações tardias quando comparado com manifestações clínicas.

Semelhante ao realizado em humanos, foi desenvolvido o Canine Activity Indices (CIBDAI), contribuindo não só com o diagnóstico como também com a avaliação do tratamento instituído (JERGENS, 2001; JERGENS et al., 2003; JERGENS, 2004; SIMPSON; JERGENS, 2011). Esta ferramenta é composta por seis variáveis que buscam definir o *status* global da DIIC e minimizar a subjetividade

que pode estar presente em avaliações clínicas, uma vez que depende da capacidade de percepção tanto do proprietário quanto do veterinário (JERGENS, 2002). No que diz respeito ao acompanhamento clínico do paciente, deve ser considerado um critério simples e factível, uma vez que avaliações de populações inflamatórias em tecidos intestinais e mensurações de mediadores inflamatórios são impraticáveis seqüencialmente. Sua criação nasceu da necessidade de se ter uma forma simples, útil e real com utilidade tanto para o diagnóstico quanto para a avaliação do tratamento e como possível preditor de recidivas. Para a utilização deste índex, atribui-se valores que variam de 0 a 3 segundo a magnitude da alteração, variando entre 0 para normal ou ausência de alteração até 3, quando se caracteriza uma alteração severa. As variáveis analisadas incluem atitude/atividade do animal, apetite, presença de vômito, consistência das fezes, freqüência de defecação e perda de peso. A somatória dos valores atribuídos classifica a doença como insignificante (0 a 3), leve (4 a 5), moderada (6 a 8) ou severa (acima de 9). As variáveis e suas respectivas notas, bem como a interpretação do escore estão ilustrados na figura abaixo:

Figura 1 – Critério de determinação de índice de atividade da doença inflamatória intestinal crônica em cães - FMVZ/USP – São Paulo – 2012



Fonte: adaptado de Jergens et al., 2003

Em 2003, Jergens et al. não só criaram o escore de atividade do DIIC a partir de escores previamente publicados para humanos como também buscaram correlacioná-lo a critérios como a severidade histológica das lesões e concentração sérica de proteína C reativa, sendo este último um critério objetivo. Os autores verificaram que os valores de escore e de PCR estavam dramaticamente elevados em animais doentes, particularmente em animais com índices superiores a 5, considerados moderados à severos. Além disso, ambos os índices apresentaram decréscimo importante após a instituição do tratamento. Desde então, tem sido usado como uma das formas de avaliar os animais acometidos e demais critérios diagnósticos propostos. Entretanto, o mesmo não foi observado por McCann et al. em 2007. Estes autores não notaram correlação estatisticamente significantes entre CIBDAI e grau de lesão histopatológica nem entre CIBDAI e valores séricos de proteína C reativa.

2.5 Marcadores laboratoriais da doença inflamatória intestinal crônica

Os marcadores laboratoriais representam uma forma objetiva de avaliar desordens do trato digestivo e devem ser pouco ou não invasivo e de simples realização. Além de auxiliarem no diagnóstico da afecção e na avaliação do tratamento, são úteis para predizer possíveis recidivas agudas do quadro. Estas ferramentas são particularmente importantes na DIIC uma vez que se trata de uma afecção com sinais clínicos inespecíficos e subjetivos. Desta forma, a possibilidade de se mensurar objetivamente estes sinais tem sido amplamente estudada. Alem disso, podem evitar a necessidade de repetidas intervenções consideradas invasivas como a realização de endoscopias seqüenciais para monitorar a evolução da doença, sendo traduzido em menor morbidade e mortalidade ao paciente, menores gastos e dificuldade na condução do caso.

Dentre os marcadores biológicos disponíveis, os relacionados à fase aguda da inflamação tem recebido atenção especial visto que a inflamação está intimamente relacionada ao desenvolvimento da DIIC.

2.5.1 Fator de necrose tumoral (TNF-α)

Trata-se de uma importante citocina pró-inflamatória que exerce papel central na inflamação, metabolismo e apoptose. É uma proteína trans-membrânica tipo II expressa por células como linfócitos B, células do epitélio colunar colônico, células *natural killer* (NK), macrófagos, monócitos, linfócitos T CD4+ e CD8+, mastócitos, neutrófilos e plasmócitos. Está envolvido em grande número de processos fisiológicos e patológicos e promove infiltração de células inflamatórias por estimular moléculas de adesão leucocitária em células endoteliais, além de servir de agente quimiotático para monócitos e ativar mecanismos fagocitários. Uma das conseqüências da estimulação do TNF-α é o aumento de proteína C-reativa, importante marcador de inflamação e injúria tecidual produzido no fígado e fortemente relacionado à DIIC (JERGENS et al., 2009)

Mahmud et al. (1995) notaram níveis séricos elevados de TNF-α em pacientes acometidos por DIIC principalmente quando a doença encontrava-se ativa. Embora estes autores tenham observado correlação entre valores de TNF-α, índex clínico de atividade da doença e microalbuminemia, não foi estabelecida correlação com proteína C reativa.

Face a importância do TNF-α na DIIC que diversos grupos de pesquisa estudaram desde a década passada o uso de agentes anti-TNF como opção terapêutica desta afecção. (COFFIN et al. 2011). Embora sejam relatadas complicações associadas a este tipo de tratamento, principalmente no que se refere à toxicidade hepática, este tipo de terapia apresenta eficiência comprovada. (COFFIN et al., 2011).

2.5.2 Proteína C-reativa

Trata-se de uma proteína pentamérica composta por cinco monômeros, produzida por hepatócitos e de curta meia vida. É considerado o membro mais importante da família das proteínas de fase aguda envolvidas na inflamação em humanos e em cães. Em condições normais, é produzido em baixas quantidades

porem, seus valores são dramaticamente aumentados na presença de processos inflamatórios de natureza distintas, com aumentos de até 1000 vezes (STEINER, 2012). É tipicamente envolvida na regulação da resposta inicial à inflamação e na regulação da atividade do sistema imune (STEINER, 2012). Embora seja um importante indicador de inflamação, não apresenta especificidade em suas respostas, o que quer dizer que pode apresentar elevações em inflamações de naturezas diversas e deve-se ter isto em mente quando da sua utilização clínica. Na DIIC tem se mostrado um promissor uma vez que a afecção é baseada em processos inflamatórios exacerbados e anormais no trato digestivo. É considerado um marcador muito importante no diagnostico, mas principalmente, na avaliação do tratamento e na monitorização de quadros de recaídas e reaparecimento dos sintomas (VERMEIRE; VAN ASSCHE; RUTGEERTS, 2006).

Em humanos, a mensuração da proteína C reativa (PCR) é considerada um dos melhores métodos laboratoriais de avaliação da DIIC, pois é correlacionado à atividade da doença e lesões endoscópicas (SOLEM et al., 2005), predizem recidivas da doença (VERMEIRE; VAN ASSCHE; RUTGEERTS, 2006) e contribuem na diferenciação com doenças intestinais funcionais (POULLIS et al., 2002).

Esta proteína é comumente mensurada por testes ELISA e este teste foi validado e está disponível comercialmente para cães (BERGHOFF; STEINER, 2011).

2.5.3 Calprotectina

Esta proteína ligante de cálcio e zinco pertencente à família das proteínas S100 apresenta papel relevante na inflamação uma vez que é considerada uma proteína citoplasmática pró-inflamatória secretada preferencialmente, porem não exclusivamente, por granulócitos. O nome calprotectina vem de sua ligação com o cálcio e de apresentar propriedades antimicrobianas (HEILMANN; SUCHODOLSKI; STEINER, 2008a,b) . Este complexo protéico formado pelos subtipos S100A8 e S100A9 possui tamanho molecular de 36kDa e é a proteína mais encontrada no citosol de granulócitos ela representa cerca de 60% das proteínas do citosol de neutrófilos (LANGHORST et al., 2008; VERMEIRE; VAN ASSCHE; RUTGEERTS,

2006). Sua concentração fecal é estável por cerca de sete dias a temperatura ambiente e pode ser mensurado, entre os métodos disponíveis, por testes ELISA tanto em fezes quanto em soro sanguíneo (KAISER et al., 2007; VERMEIRE; VAN ASSCHE; RUTGEERTS, 2006). São descritas atividades imunomodulatórias, antimicrobianas e antiproliferativas relacionadas à calprotectina (CANANI et al., 2008; HEILMANN; SUCHODOLSKI; STEINER, 2008a,b; AOMATSU et al., 2011).

Uma vez liberada de neutrófilos e monócitos ativados em conseqüência de danos e morte celular, esta proteína apresenta funções extracelulares relacionadas à ativação de diversas reações produtoras de citocinas inflamatórias e atividade fagocitária (KAISER et al., 2007). Por este motivo, é considerado um marcador laboratorial importante para mensurar processos inflamatórios incluindo a DIIC (SIDLER et al., 2008; LANGHORST et al., 2008; AOMATSU et al., 2011). Bunn et al. (2001) propõem correlação da calprotectina fecal com os marcadores invasivos da inflamação intestinal e o ^{99}Tc, escores estes obtidos pela avaliação por endoscopia e histologia. A comparação entre escore endoscópico e calprotectina fecal também foi realizado por Aomatsu et al. (2011) em crianças acometidas por DIIC e observou-se forte correlação entre eles. Alem disto, níveis fecais de calprotectina mostraram-se significantemente elevados em pacientes com doença ativa quando comparados a pacientes em remissão e crianças saudáveis, tanto para pacientes com retocolite ulcerativa quanto com doença de Crohn.

Canani et al. (2008) descreveram alta correlação entre calprotectina fecal, estadiamento histológico e endoscópico de inflamação da mucosa. Além disso, caracterizaram esta proteína como um marcador superior quanto à especificidade e sensibilidade quando comparado a escores clínicos, taxa de sedimentação eritrocitária e proteína C reativa.

Em cães, esta proteína foi purificada e caracterizada por Heilmann; Suchodolski; Steiner (2008b) que também validaram a mensuração desta substância por testes de radioimunoensaio (HEILMANN; SUCHODOLSKI; STEINER, 2008a). Estes autores acreditam que esta proteína possa apresentar utilidade na avaliação da DIIC em cães acometidos.

2.5.4 Proteína S100A12

Também conhecida como calgranulina C entre outros nomes, esta proteína ligante de cálcio pertence à família das proteínas S100 assim como a calprotectina. Uma vez liberada de neutrófilos e monócitos ativados em conseqüência de danos celulares, infecção ou inflamação, a S100A12 pode estar envolvida em diversos mecanismos inflamatórios entre eles, a ativação do fator nuclear Kappa B (NF-κB) e de receptores de reconhecimento padrão (PRR - *pattern recognition receptor*), sendo que este último mecanismo leva a expressão de citocinas pro-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF-alpha). Alem disto, a S100A12 está envolvida na amplificação e perpetuação de respostas inflamatórias tradicionais relacionados a receptores RAGE (*receptor for advanced glycation endproducts*), relacionados com a patogênese da DIIC em humanos. Na medicina, esta proteína é considerada um marcador sensível e específico de processos inflamatórios específicos como inflamações gastrointestinais e pode ser mensurado em plasma, soro sanguíneo e amostras fecais (GAYA; MACKENZIE, 2002). Kaiser et al. (2007) descrevem também a importância da S100A12 como biomarcador não invasivo e esta sendo mais uma ferramenta na identificação e mensuração de inflamação intestinal, quer no diagnostico como na quantificação de atividade inflamatória nas afecções de curso crônico. Sidler, Leach e Day (2008) utilizou crianças com sinais gastrointestinais compatíveis com DIIC para mensurar valores séricos de S100A12, valores fecais de S100A12 e calprotectina e correlacionar com testes padrões como valores de proteína C reativa, albumina e plaquetas. Estes autores observaram que ambos marcadores fecais apresentaram maior especificidade e sensibilidade quando comparados a testes inflamatórios padrões no diagnóstico das afecções intestinais, porem o S100A12 mostrou-se excepcionalmente específico na diferenciação entre crianças com e sem DIIC, sendo relatado como um teste não-invasivo simples que deve ser utilizado como teste de triagem para a investigação de sintomas gastrointestinais nestes pacientes. Observações semelhantes foram realizadas por De Jong, Leach e Day (2006). Para estes autores, valores fecais de S100A12 são úteis na diferenciação entre pacientes acometidos por DIIC e crianças saudáveis. Além disto, observa-se correlação destes valores com índices de atividade da doença, marcadores inflamatórios como proteína C reativa, albumina, plaquetas e

taxa de sedimentação eritrocitária além de diminuição nos valores de S100A12 quando da instituição de tratamento adequado.

Para cães, esta proteína foi purificada e caracterizada pela primeira vez em 2010 por Heilmann, Suchodolski e Steiner. Em 2011, este mesmo grupo de pesquisa realizou validação analítica de teste de radioimunoensaio para a determinação de valores séricos e fecais desta proteína nestes animais alem de definir intervalos de referência (33.2-225.1µg/L para amostras de soro sanguíneo e <24-745 ng/g para amostras fecais). Embora alterações moderadas de concentrações séricas de S100A12 possam ser clinicamente relevantes, os autores acreditam que o uso do intervalo de confiança baseado em uma população deva requerer atenção especial (HEILMANN; SUCHODOLSKI; STEINER, 2011). Estudos clínicos nesta espécie animal ainda estão em fase de desenvolvimento. Desta forma, a aplicabilidade clínica deste marcador em cães ainda deve ser extensamente analisada.

2.5.5 Folato e Cobalamina

O folato (ácido fólico, vitamina B_9) é uma vitamina hidrossolúvel produzida por plantas e muitas espécies de bactérias. A maioria dos alimentos comerciais de animais de companhia fornecem quantidade suficiente desta substância e deficiências dietéticas são incomuns. Sendo assim, alterações séricas de folato são freqüentemente associadas a diminuição de sua absorção ou possíveis alterações na microbiota intestinal (BERGHOFF; STEINER, 2011).

A absorção do folato proveniente da dieta ocorre em sua maior parte na porção proximal de intestino delgado. Para tanto, a enzima folato desconjugase presente na borda da escova do epitélio intestinal transforma folato na forma de poliglutamato em monoglutamato, que é absorvido por transporte ativo. Desta forma, a diminuição sérica de folato pode sugerir uma lesão da porção proximal do intestino delgado. Dentre as possíveis causas destas lesões, a sensibilidade dietética, a DIIC e o linfoma apresentam destaque (BATT, 2009).

Muitas espécies de bactérias podem produzir folato, incluindo bactérias residentes da microbiota de intestino delgado. Quadros de disbiose, nos quais se tem desequilíbrio das populações bacterianas residentes, maior quantidade de folato

pode ser produzido e liberado no lúmen intestinal (BERGHOFF; STEINER, 2011). Entretanto, os autores descrevem que a mensuração sérica de folato não é um teste sensível para o diagnóstico de disbiose e, conseqüentemente, de supercrescimento bacteriano intestinal.

A cobalamina (vitamine B_{12}) é uma vitamina hidrossolúvel facilmente encontrada em níveis suficientes em alimentos para cães e gatos. Sua deficiência alimentar é raro e níveis diminuídos desta substância estão associados a distúrbios no mecanismo de absorção (BERGHOFF; STEINER, 2011).

Diferentemente do folato, a cobalamina alimentar é absorvida especificamente na porção distal do intestino delgado através de um mecanismo extremamente complexo. Por se tratar de uma molécula muito grande, não é capaz de atravessar a abarreira do epitélio intestinal por difusão ou por transporte ativo, o que ocorre com os demais nutrientes. Esta absorção envolve a combinação da cobalamina a uma proteína de ligação específica denominada "fator intrínseco" que, por sua vez, liga-se a receptores específicos presentes apenas na superfície das células intestinais do íleo. Esta ligação induz a endocitose de mediação celular do complexo FI-cobalamina para o interior de células ileais. Este FI é sintetizada pelo estômago na maioria dos animais, incluindo o homem e o cão. Para o cão, o pâncreas também contribui na produção deste fator. Níveis diminuídos de cobalamina podem indicar lesão da porção distal do delgado e, quando acompanhadas de concentrações baixas de folato sérico, sugere-se uma doença difusa, potencial e relativamente severa que afeta tanto a porção proximal quanto distal do intestino. A diminuição sérica de cobalamina e/ou elevações de folato podem constituir indicador direto de supercrescimento bacteriano intestinal, igualmente conhecido como diarreia responsiva a antibióticos. A quantidade elevada de bactérias na porção proximal do intestinal delgado, em particular anaeróbios como *Clostridium e Bacterióides spp*, são capazes de se ligarem a cobalamina e impedirem sua absorção no íleo distal. Associado, a alta concentração destas bactérias, que são capazes de realizar síntese de folato, podem resultar em altos índices desta substancia (BATT, 2009).

De maneira geral, níveis séricos de folato diminuídos podem estar relacionados a baixa ingestão alimentar, utilização de alguns fármacos além de lesão do intestinal delgado proximal. Valores aumentados de folato estão associados a quadros de supercrescimento bacteriana, insuficiência pancreática, ingestão

alimentar elevada ou suplementação vitamínica. Quanto a cobalamina, sua diminuição pode estar relacionada à lesão do intestino delgado distal, supercrescimento bacteriano, insuficiência pancreática, síndromes de má absorção hereditária de cobalamina e ingestão alimentar reduzida. Em contrapartida, valores superiores aos de referência podem ser observados quando da ingestão alimentar elevada, suplementação vitamínica ou doença imunoproliferativa (BATT, 2009).

De forma geral, folato e cobalamina podem contribuir para o diagnóstico de doenças do intestino delgado em cães. Entretanto, a presença de valores normais destas proteínas não permitem a exclusão de doenças intestinais (BATT, 2009). Mensurações séricas de folato e cobalamina auxiliam não apenas na localização da lesão em pacientes com trato gastrointestinal acometido bem como no tratamento por suplementação vitamínica e definição do prognóstico (SIMPSON; JERGENS, 2011).

2.5.6 Marcadores laboratoriais na doença inflamatória intestinal crônica em pequenos animais

Na medicina veterinária, o uso de marcadores laboratoriais para a detecção e monitorização de processos inflamatórios localizados ou sistêmicos são necessários, visto que representam um desafio diagnóstico, porém escassos (HEILMANN; SUCHODOLSKI; STEINER, 2011). Apenas um número limitado de marcadores para DIIC foi avaliado, incluindo concentrações colônicas de nitrito e imunoglobulina G (GUNAWARDANA et al., 1997), quantificação de anticorpos citoplasmáticos perinucleares antineutrofílicos (ALLENSPACH et al., 2004; LUCKSCHANDER et al., 2006), análise fenotípica de populações de células inflamatórias (GERMAN et al., 2001) e expressão de RNA mensageiro de citocinas intestinais (PETERS et al., 2005). Jergens et al. (2003) estabeleceram correlação entre CIBDAI, estadiamento histopatológico da doença e quantificação de proteínas de fase aguda, considerando a proteína C reativa o melhor marcador de atividade inflamatória em cães com doenças consideradas moderadas ou severas. McCann et al. (2007) observou aumento desta proteína em 15 dos 16 cães portadores de DIIC incluídos em seu

estudo, porém sem correlação com a severidade da doença definida pelo CIBDAI ou graduação histopatológica. Estes autores não detectaram TNF-α nestes animais.

Jergens et al. (2010) relatam que a proteína C reativa pode estar normal ou aumentada em cães com DIIC porem este biomarcador deva ser utilizado como importante ferramenta de avaliação de resposta a tratamento, principalmente quando utilizada de forma comparativa entre um mesmo indivíduo.

A mensuração da expressão de citocinas inflamatórias também foi realizada por German et al. (2000) em cães da raça Pastor Alemão com enteropatias (DIIC e supercrescimento bacteriano). Foi observado aumento dos níveis de IL-2, IL-5, IL12p40, TNF-α e TGF-β em animais acometidos. Entretanto, não foi possível identificar diferença nestes parâmetros entre estas duas afecções. Após a instituição do tratamento, os pacientes obtiveram valores inferiores de TNF-α e TGF-β, o que pode ser explicado pela inibição do processo inflamatório e resposta imune da mucosa intestinal. De forma semelhante, IL-6, IL-10, IL12p4a, TNF-α e TGF-β apresentaram-se elevados em gatos com sinais de DIIC. Nguyen et al. (2006) observaram correlação entre estes achados e grau de alterações histopatológicas.

Entretanto, De Majo (2008) quantificaram mRNA de TNF-α e IFN-γ em biópsias de mucosa duodenal de cães afetados por DIIC sem observar aumento estatisticamente significante quando comparado a cães controle o que , segundo os autores, esta em concordância com Fujiwara et al. (2002) e Peters et al. (2005).

Em humanos, a DIIC está freqüentemente relacionada a aumento de infiltrado neutrofílico enquanto que nos cães, está preferencialmente relacionado a infiltrados linfoplasmocíticos e, em menor escala, eosinofílico (BERGHOFF; STEINER, 2011). Como descrito anteriormente, a família de proteinas S100 é mais abundante em neutrófilos e sua elevação em humanos com DIIC é facilmente entendida. A associação de elevações destas proteínas com cães acometidos por DIIC é inicialmente contra-intuitiva porem, observada em alguns estudos (BERGHOFF; STEINER, 2011). German et al. (2001) descrevem o aumento do número de células marcadas positivamente para calprotectina em cães com DIIC comparado a cães saudáveis. Jergens et al. (2010) notaram elevação significativa da expressão de S100-mRNA em mucosas de cães doentes. Além disto, a expressão de calprotectina pode ser induzida em vários tipos celulares, incluindo células epiteliais (ERHCHEN et al., 2009).

3 OBJETIVO

- Diagnosticar a doença inflamatória intestinal crônica em animais da espécie canina acometidos por sinais gastrointestinais crônicos.
- Definir parâmetros que contribuam para o diagnóstico de DIIC em cães através da correlação entre:
    - Índice de atividade da DIIC em cães (CIBDAI).
    - Achados endoscópicos.
    - Achados histopatológicos segundo classificação proposta pela *World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group* (WSAVA).
    - Mensuração sérica de proteína C reativa.
    - Mensuração sérica e fecal de calprotectina.
    - Mensuração sérica e fecal da proteína S100A12.
    - Mensuração sérica de TNF-α.
    - Mensuração sérica de folato e cobalamina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), protocolo n°1601/2009. Os proprietários dos animais selecionados foram previamente informados e assinaram o termo de consentimento para inclusão no estudo.

4.1 Seleção dos animais

4.1.1 Grupo afetado

Foram utilizados 20 animais da espécie canina, provenientes do Serviço de Clinica Médica do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo durante o período de Outubro de 2009 a Setembro de 2011, independente de padrões raciais, etários ou sexuais.

- Critérios de inclusão – os cães deviam apresentar sinais clínicos por período mínimo de três semanas, o que definiu o caráter crônico do quadro.
- Critérios de exclusão – os cães com parasitismo gastrointestinal ou em tratamento para evitarmos subestimar os parâmetros analisados.

4.1.2 Grupo controle

Foram selecionados 20 animais saudáveis e sem histórico de comprometimento gastrointestinal para a composição do grupo controle. Avaliações clínicas e laboratoriais foram realizadas para a confirmação da inclusão do animal no grupo. A presença de parasitismo em todos os cães do grupo controle foi excluída através da realização de exames coproparasitológicos pelo Laboratório de Doenças

Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPS-FMVZ/USP).

4.2 Colheita de amostras fecais e sanguíneas

Amostras fecais dos animais afetados foram coletadas nos três dias antecessores aos exames endoscópicos. As amostras sanguíneas foram coletadas imediatamente antes do inicio dos procedimentos e realizou-se centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos para a obtenção de soro sanguíneo. Todas as amostras foram fracionadas, transferidas para tubos *eppendorf,* identificadas e armazenadas à temperatura de -80°C em freezer[1] até realização dos ensaios laboratoriais. Mesmo sem a realização de avaliações endoscópicas nos animais do grupo controle, o mesmo protocolo foi realizado para a aquisição das amostras fecais e sanguíneas. Desta forma, as amostras de fezes foram coletadas nos três dias anteriores ao dia da coleta da amostra sanguínea.

4.3 Estabelecimento do escore clínico de atividade da doença inflamatória intestinal crônica

Para tanto, baseou-se nos escore definido por Jergens (2003). Foram utilizados seis variáveis de sinais clínicos gastrointestinais sendo eles: atitude/atividade do animal, apetite, vômito, consistência de fezes, freqüência de defecação e perda de peso. Para cada variável, cada animal recebeu uma nota quanto ao grau de alteração:

- 0 quando foi considerado normal.
- 1 quando apresentou alteração leve.
- 2 para alteração moderada.

[1] Ultrafreezer vertical -86°C, linha Vip, modelo MDF-U53VC, 518L, Sanyo, Bensenville, USA

- 3 para alteração severa.

A somatória destas notas definiu o escore clínico de cada animal no momento do diagnóstico endoscópico. De acordo com o escore obtido, cada animal foi classificado quanto à severidade da atividade da doença.

- 0 e 3 foram considerados com doença clinicamente insignificantes.
- 4 a 5, com doença leve.
- 6 a 8, com doença moderada e 9 ou mais, com doença severa.

Apenas para a análise de determinados testes estatísticos, o grupo afetado foi dividido em subgrupo afetado I e subgrupo afetado II, baseando-se no escore clínico atribuído a cada animal. Cães com escore variando entre 0 e 5 foram incluídos no subgrupo afetado I enquanto que animais com escore igual ou superior a 6 foram inseridos no subgrupo afetado II.

4.4 Avaliação endoscópica dos animais

Foi realizado avaliação endoscópica de todos os animais incluídos no grupo dos afetados. A escolha do tipo de exame endoscópico foi baseado nos sinais e sintomas relatados, podendo ser: esofagogastroduodenoscopia isolada, colonoscopia isolada e esofagogastroduodenoscopia associada a colonoscopia. Para a realização do procedimento, todos os animais foram avaliados por exame clinico e laboratorial, por meio de exame hematológico, bioquímico e ultrassonográfico. Os exames laboratoriais foram realizados no Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da FMVZ/USP. O protocolo anestésico utilizado durante o procedimento foi definido pelo Serviço de Anestesia desta instituição, levando-se em conta características individuais dos animais. Durante o procedimento, os pacientes foram mantidos sob anestesia inalatória e em decúbito lateral esquerdo. Os exames endoscópicos foram realizados com aparelho videogastroscópio[2] com diâmetro externo de 9,8mm e comprimento de 108cm associado à processadora[3] e fonte de luz[4] com qualidade de imagem de alta

[2] Videogastroscópio GIF-H180, Olympus, Japão
[3] Processadora CV180, linha Evis Exera II, Olympus, Japão
[4] Fonte de Luz CLV180, linha Evis Exera II, Olympus, Japão

definição. As imagens referentes a cada animal foram gravadas[5] e posteriormente analisadas.

Para a padronização da avaliação endoscópica, utilizou-se adaptação da padronização recomendada pelo Comparative Gastroenterology Society (CGS). Os parâmetros utilizados para a avaliação de cada porção seguem nos quadros 1 e 2. Foram estabelecidos escores endoscópicos para estômago, duodeno e cólon de todos os animais avaliados. Para tanto, utilizou-se uma adaptação do escore publicado por Allenspach et al (2007) sendo que atribui-se:

- escore 0 para mucosas consideradas normais por endoscopia.
- escore 1 para mucosas com leve aumento de eritema, edema e tecido friável.
- escore 2 para mucosas plenamente edemaciadas, eritematosas, friáveis e/ou erosões superficiais e diminutas.
- escore 3 para amostras com acentuado eritema, edema e friável, apresentando sangramento fácil e/ou ulcerações visíveis.

Apenas para a análise estatística, determinou-se o escore endoscópico máximo de cada animal, selecionando-se o maior valor de escore dentre os segmentos avaliados.

Quadro 1 – Descrição da padronização dos parâmetros avaliados durante esofagogastroduodenoscopia - FMVZ/USP – São Paulo – 2012

ESÔFAGO	ESTÔMAGO	DUODENO
Hiperemia	Insuflação	Insuflação
Descoloração	Hipermia	Visibilização da papila
Friável	Edema	Hiperemia
Hemorragia	Descoloração	Edema
Erosão/Ulceração	Friável	Descoloração
Conteúdo (muco, alimento)	Hemorragia	Friável
Estenose	Erosão/Ulceração	Hemorragia
Transição esôfago gástrica	Conteúdo (muco, alimento)	Erosão/Ulceração
	Aspecto do piloro (estenose, deformidade, transposição)	Conteúdo (muco, alimento)

[5] Gravador de DVD, modelo DVD-R150, Samsung

Quadro 2 – Descrição da padronização dos parâmetros avaliados durante colonoscopia - FMVZ/USP – São Paulo – 2012

ÍLEO	CECO	CÓLON
Insuflação	Insuflação	Hiperemia
Hiperemia	Hiperemia	Descoloração
Edema	Edema	Friável
Descoloração	Descoloração	Hemorragia
Friável	Friável	Erosão/Ulceração
Hemorragia	Hemorragia	Conteúdo (muco, fezes)
Erosão/Ulceração	Erosão/Ulceração	Dilatação
	Textura	Estenose

Durante os exames de endoscopia, foram coletadas amostras teciduais de locais padronizados. O número de amostras coletadas em cada segmento variou quanto à possibilidade de execução porém, sempre com números superiores à três. Estas regiões foram: corpo do estômago e duodeno na EGD; íleo e segmentos de cólon na colonoscopia. Em casos específicos de alterações em regiões diferentes das padronizadas, amostras teciduais destes segmentos foram coletadas e incluídas na avaliação histopatológica. Para a coleta das biópsias, utilizaram-se pinças de biópsia[6,7].

4.5 Avaliação histopatológica dos fragmentos de biópsias endoscópicas

As amostras foram mantidas em formol 10% por pelo menos 48 horas e posteriormente enviadas para processamento e análise histopatológica no Departamento de Patologia desta faculdade.

Das biópsias realizadas durante os procedimentos endoscópicos, foram confeccionadas lâminas de cortes histológicos de 5µm no Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP).

A avaliação histopatológica dos materiais coletados se deu em dois momentos diferentes. Para fins de diagnóstico e inclusão no estudo, todos os fragmentos foram inicialmente submetidos à avaliação de rotina do Serviço de Patologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da

[6] Pinça de biópsia, modelo Fenestrado Standard (FB-25K-1), Olympus, Japão
[7] Pinça de biópsia, modelo mandíbula de crocodilo (FB-220K.A), Olympus, Japão

Universidade de São Paulo (VPT-FMVZ/USP). Uma vez incluídos no estudo, estes materiais foram depois reavaliados com a supervisão do Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias segundo classificação proposta pela *World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group* – WSAVA (DAY et al., 2008), como descrito no quadro 3. Neste estudo, foram analisadas diferentes regiões anatômicas: corpo e antro gástrico, duodeno e cólon. Para cada uma destas regiões, diversos parâmetros foram considerados sendo que sempre foram agrupados em alterações morfológicas e inflamatórias. Em cada critério estabelecido, cada animal foi classificado quanto ao grau de alteração variando entre normal (ausência de lesões), alterado leve, moderado até alterado marcante. Posteriormente, estes critérios foram transformados em escores numéricos para facilitar sua compreensão e utilização estatística em comparação com os demais parâmetros realizados. Para tanto, cada classificação recebeu um valor numérico que variou de:

- 0 para tecido normal/ausência de lesões.
- 1 para alteração leve.
- 2 para alteração moderada.
- 3 para alteração marcante/severa.

Estes valores foram somados e, desta forma, estabelecido o escore de cada animal para cada segmento anatômico avaliado.

Quadro 3 – Descrição da padronização dos parâmetros histológicos avaliados para os diferentes segmentos gastrointestinais - FMVZ/USP – São Paulo – 2012

ESTÔMAGO	— Injúria superfície epitelial — Injúria epitelial fossetas gástricas — fibrose/ninho glandular/atrofia mucosa — Linfócito intraepitelial — Linfócito e plasmócito em lâmina própria — Eosinófilo em lâmina própria — Neutrófilo em lâmina própria — Outras
DUODENO	— Achatamento/atrofia de vilosidade — Injúria superfície epitelial — Distensão de criptas — Dilatação de linfático — Fibrose da mucosa — Linfócito intraepitelial — Linfócito e plasmócito em lâmina própria — Eosinófilo em lâmina própria — Neutrófilo em lâmina própria — Outras
CÓLON	— Injúria superfície epitelial — Hiperplasia de criptas — Dilatação/distorsão de criptas — Fibrose/atrofia — Linfócito e plasmócito em lâmina própria — Eosinófilo em lâmina própria — Neutrófilo em lâmina própria — Macrófago em lâmina própria

4.6 Processamento laboratorial

4.6.1 Fator de necrose tumoral (TNF-α)

A mensuração sérica de TNF-α foi realizada por meio de teste imunoenzimático ELISA através de kit comercialmente disponível[8] previamente validado para soro sanguíneo canino. O protocolo seguiu as instruções fornecidas pelo fabricante. As mensurações foram realizadas no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (LMMD-FZEA/USP).

[8] Canine TNF-α, Quantikine, CATA00, R&D Systems,, Minneapolis, USA

4.6.2 Proteína C-reativa

As mensurações séricas de proteína C reativa dos animais incluídos no estudo foram realizadas por teste imunoenzimático ELISA através de kit comercialmente disponível[9] previamente validado para uso em animais da espécie canina. O protocolo para a realização dos testes seguiu as instruções do fabricante e a padronização prévia do Gastrointestinal Laboratory (GI Lab – Texas A&M University). Os valores de referência estabelecidos variaram entre 0 e 7,6 mg/L. As mensurações foram realizadas no GI Lab

4.6.3 Calprotectina

Utilizou-se a técnica de teste imunoenzimático ELISA para a mensuração da proteína calprotectina em amostras de soro sanguíneo e fezes tanto dos animais do grupo afetado quanto do grupo controle. No que se refere à avaliação fecal, foram utilizadas amostras de três dias consecutivos porém optou-se por utilizar para a análise estatística apenas a média dos dois valores mais próximos, excluindo-se assim, o valor que apresentou-se mais discrepante dos demais. As mensurações foram realizadas no GI Lab.

4.6.4 Proteína S100A12

Utilizou-se a técnica de radioimunoensaio competitivo de fase líquida para a mensuração da proteína S100A12 em amostras de soro sanguíneo e fezes tanto dos animais do grupo afetado quanto do grupo controle. No que se refere à avaliação fecal, foram utilizadas amostras de três dias consecutivos porém optou-se por utilizar para a análise estatística apenas a média dos dois valores mais próximos, excluindo-

[9] “Phase” C-Reactive Protein/CRP Canine kit, Tridelta, Maynooth, Ireland

se assim, o valor que apresentou-se mais discrepante dos demais. As mensurações foram realizadas no GI Lab.

4.6.5 Folato e Cobalamina

A mensuração realizada pelo GI Lab foi por meio de técnicas de imunoensaio realizadas no aparelho automatizado[10]. O kit de cobalamina[11] apresenta-se como um ensaio competitivo enzimático de fase sólida, por quimioluminescência, que implica em um procedimento automático de desnaturação alcalina. O kit de ácido fólico[12] também se baseia na realização de teste de imunoensaio competitivo.

4.7 Análise estatística

Os parâmetros epidemiológicos, clínicos e endoscópicos foram analisados de forma descritiva em forma de freqüência absoluta (n), freqüência relativa (%) e/ou média e desvio-padrão.

Quanto aos parâmetros histopatológicos, as variáveis classificatórias foram apresentadas em tabelas de contingência contendo freqüências absolutas (n) e relativas (%).

As variáveis quantitativas não paramétricas foram avaliadas com teste de comparação de medianas de Mann-Whitney.

Na comparação entre medianas dos subgrupos (afetado I, afetado II e controle) utilizou teste de Kruskal-Wallis. Quando significante, utilizou-se o teste de comparação múltipla de Dunn para discriminar as diferenças entre os grupos.

As correlações pertinentes entre as variáveis estudadas foram avaliadas segundo coeficiente de correlação de Spearman.

Os valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

---

[10] “Immulite 2000 Immunoassay System - Siemens®”
[11] Vitamin B12-L2KVB6, Siemens
[12] Folic Acid-L2KFO6, Siemens

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros epidemiológicos

Foram incluídos no presente estudo 20 animais que contemplaram os critérios pré-definidos de acordo com a metodologia proposta e descrita previamente (Quadro 4). Todos os caninos afetados apresentavam sinais clínicos de vômito e/ou diarréia por períodos superiores há três semanas.

A mediana da idade destes pacientes foi dois anos, com valores mínimo e máximo de um e 10, respectivamente. Podemos justificar este resultado devido ao avanço da medicina veterinária que atualmente possui maior numero de especializações e disponibilidade de novos exames complementares. Bem como o maior esclarecimento da população fez com que estes pacientes fossem encaminhados precocemente ao atendimento. Isto refletiu numa menor faixa etária dos animais acometidos. Além disso, observa-se uma representatividade maior de fêmeas em relação aos machos quando se analisa a distribuição sexual da amostra, composta por 13 fêmeas (65%) e 7 machos (35%). Quanto à distribuição racial, 10 raças foram representadas além de animais sem padrão racial. A distribuição encontra-se no gráfico 1.

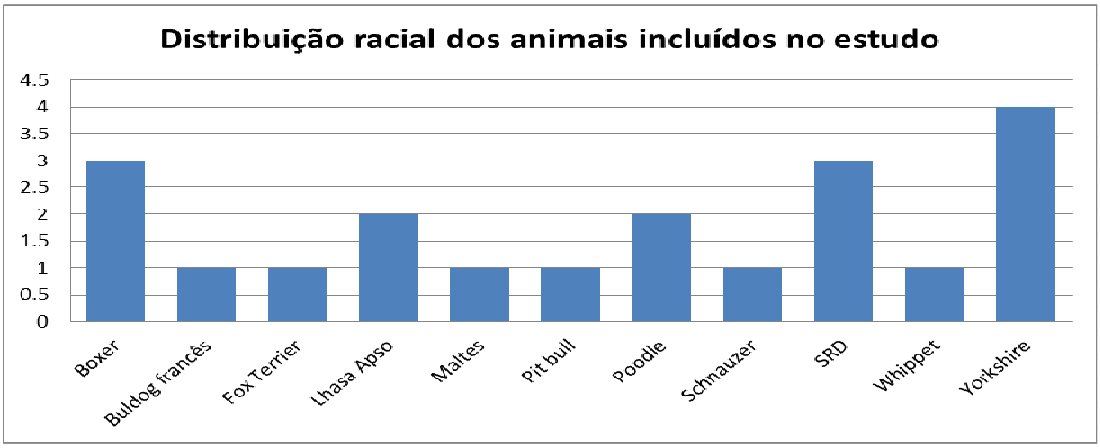
Dos 20 animais incluídos, 17 apresentavam vômitos (85%) como uma das manifestações da doença enquanto 11 diarréia (55%). Além destes sintomas, emagrecimento progressivo associado ao quadro (n=4), alterações na ingestão de alimentos como disorexia, hiporexia ou apetite seletivo (n=10), prolapso retal (n=2), flatulência (n=1), disquesia (n=1) foram relatados pelos proprietários.

Os dados epidemiológicos e clínicos referentes aos animais foram compilados e estão descritos a seguir.

Quadro 4 – Distribuição dos dados epidemiológicos, escore e sinais clínicos dos pacientes - FMVZ/USP – São Paulo – 2012

Cão N°	Prontuário N°	Raça	Idade (anos)	Sexo	Escore Clínico	Sinais Clínicos		
						Vômito	Diarréia	Outros
1	180162	Schnauzer	8	M	4	-	X	Disquesia
2	205383	Lhasa Apso	4	F	6	X	-	
3	207300	Maltês	2	F	4	X	-	-
4	207485	Yorkshire	2	F	2	X	-	-
5	210197	Fox Terrier	2	F	6	X	X	-
6	210593	Poodle	1	F	5	-	X	Prolapso retal
7	192789	SRD	5	M	6	X	-	Anorexia
8	210737	Pit Bull	7	M	8	-	X	Emagrecimento, hiporexia, disquesia, sensibilidade retal
9	212104	Boxer	4	F	8	X	X	Emagrecimento, hiporexia, apatia, IRC
10	212946	Poodle	9	F	3	X	-	-
11	211117	SRD	10	F	0	X	-	Disorexia, parorexia
12	213486	Buldog francês	1	M	5	X	X	Prolapso de reto
13	213617	Yorkshire	1,5	F	5	X	X	Apetite seletivo,
14	212217	Boxer	1	M	3	X	X	-
15	216628	SRD	3	F	9	X	X	Emagrecimento, apetite seletivo
16	216704	Whippet	7	F	3	X	-	Apetite seletivo
17	211476	Lhasa apso	2	M	3	X	-	Apetite seletivo
18	218693	Yorkshire	2	F	5	X	X	-
19	218470	Boxer	1,5	F	8	X	X	Emagrecimento, hiporexia, ascite
20	216136	Yorkshire	1,5a	M	5	X	-	Apetite seletivo, Flatulência

Gráfico 1 – Representação gráfica da distribuição racial dos pacientes - FMVZ/USP – São Paulo, 2012



Quanto à avaliação ultrassonográfica, apenas três cães não apresentaram quaisquer alterações no exame. No que se refere à avaliação da cavidade gástrica, a repleção gasosa foi relatada em 10 dos 20 animais avaliados (50%) enquanto que em apenas três foram observados espessamentos da parede gástrica. Em relação a alterações intestinais, a ultrassonografia foi capaz de diagnosticar apenas três animais com espessamentos de parede intestinal; sendo que cinco animais apresentaram aumentos de linfonodos ilíacos mediais e/ou mesentérico porém todos com características de homogeneidade e regularidade. Além disto, oito cães mostraram alterações em fígado, sendo que três aumento em sua dimensão, quatro diminuição na dimensão e 2 aumento na ecogenicidade do órgão.

Sete dos 20 animais (35%) tiveram alterações nos exames laboratoriais realizados previamente à avaliação endoscópica. Três animais manifestaram elevações do número de leucócitos totais sendo que em um animal, esta elevação foi considerada muito discreta (16100 leucócitos/µL). Dois animais exibiram valores séricos de fosfatase alcalina superiores aos valores de referência estabelecidos pelo Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da FMVZ/USP (116U/L e 208U/L) enquanto que um cão apresentou valores de uréia e creatinina também elevados em relação ao mesmo laboratório (uréia=148,1mg/dL e creatinina=2,7g/dL), decorrente de alteração renal concomitante ao quadro gastrointestinal. Para completar as alterações laboratoriais observadas, um animal apresentava anemia (Ht=23%) e outro, hiperpotassemia (K=5,6 mg/dL).

O valor médio de albumina sérica dos caninos incluídos no grupo afetado foi 3,17g/dL, sendo os valores mínimo e máximo, respectivamente 1,4 e 4,1g/dL. Apenas 1 animal mostrou valor sérico de albumina inferior aos valores de referência estabelecidos pelo Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da FMVZ/USP (1,4g/dL e 2,3 a 3,8 g/dL, respectivamente).

Os dados referentes á avaliação ultrassonográfica, avaliação laboratorial e valores séricos de albumina encontram-se no quadro 5.

Quadro 5 – Descrição dos parâmetros clínicos e ultrassonográficos dos pacientes - FMVZ/USP – São Paulo – 2012

Cão	ALTERAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS	ALTERAÇÕES LABORATORIAIS	ALBUMINA SÉRICA
1	Fígado dimensões aumentadas, ecogenicidade elevada, baço com pontos de fibrose/calcificação, rins com calcificações, bexiga com cálculos e paredes irregulares; próstata, testículos e TGI sem alterações	-	2,7
2	Fígado discretamente aumentado, rins reduzidos, estômago com discreta repleção gasosa com paredes sem evidências de espessamento	-	2,9
3	Fígado, baço e bexiga sem alterações; segmentos intestinais com camada submucosa evidente sem espessamento ou irregularidade, estômago moderadamente preenchido por conteúdo gasoso e paredes passíveis de avaliação sem evidências de espessamento	K=5,6	3,4
4	Fígado, baço, rins, bexiga e útero sem alterações; estômago repleto por conteúdo gasoso, paredes passíveis de observação e segmentos intestinais sem alterações	Leucócitos 16100	3,2
5	Sem evidências de alterações ultrassonográficas	-	3,8
6	Presença de gases em todo trato gastrointestinal dificultando exame	Ht=23	3,3
7	Fígado dimensões reduzidas, contornos preservados, ecogenicidade homogenia; baço, rins, bexiga, próstata sem alterações; estômago com conteúdo gasoso, paredes sem evidência de espessamento	-	4,1
8	Baço discretamente aumentado, fígado, próstata, bexiga e rins sem alterações; linfonodos ilíacos mediais aumentado de volume, homogêneos e regulares	-	3,0
9	Baço aumentado, rim com ecogenicidade elevada, segmento intestinal mesogástrico com paredes espessadas (até 0,92cm) com camada preservada, linfonodo ilíaco medial esquerdo aumentado	Uréia=148,1; Creatinina=2,7	2,5
10	Espessamento de parede gástrica sugestiva de gastrite crônica	FA=208	3,8
11	Fígado com dimensões diminuídas, estômago repleto, conteúdo gasoso em alças paredes normoespessadas com camadas preservadas	-	3,4
12	Estomago conteúdo heterogêno e pastoso, grande quantidade, paredes espessadas (até 0,57cm); baço acentuadamente aumentado	Leucócitos=21100	3,4
13	Sem evidências de alterações ultrassonográficas	-	3,9
14	Fígado e baço com dimensões aumentadas; duodeno/pâncreas sem alterações; grande quantidade de gases, linfonodo ilíaco medial direito aumentado homogêneo, regular	FA=116	--
15	Fígado, rins, duodeno, pâncreas e bexiga sem alterações; baço com dimensões aumentadas, contorno e textura preservados; segmento intestinal mesogástrico esquerdo com discreta dilatação por conteúdo líquido (2,9cm Ø) e paredes espessadas e irregulares (até 0,98cm) com característica de camadas preservadas; cólon descendente com paredes espessadas e irregulares (0,70cm) com característica de camadas preservadas; linfonodo mesentérico com aumento de volume (3,93 x 1,05) homogêneo e regular, linfonodo ilíaco medial esquerdo com aumento de volume (1,95 x 0,85) homogêneo e regular	Leucócitos 36600 neutrofilia, eosinofilia, monocitose	2,4
16	Fígado, rins e baço sem alterações; estomago com conteúdo gasoso e paredes normoespessadas (0,2cm), alças intestinais com distribuição, diâmetro e estratificação normais, paredes normoespessadas, peristaltismo evolutivo; bexiga com estrutura 0,76x0,76-pólipo?	-	3,3
17	Estomago com conteúdo pastoso e paredes visíveis sem evidência de espessamento. Fígado, baço, rins, bexiga e próstata sem alterações	-	3,5
18	Figado com ecogenicidade discretamente diminuida; rins: contornos pouco definidos, ecogenicidade discretamente aumentada, dimensões reduzidas; bexiga e baço sem alterações; cólon descendente discreto espessamento e irregularidade de paredes (0,36cm sem característica de camadas)	-	3,2
19	Fígado aumentado, discreta-moderada liquido livre em abdômen com moderada celularidade, linfonodo mesentérico e ilíaco medial direito ⇧ homogêneo, regular; estômago com paredes acentuadamente espessadas (até 1,5cm) com irregularidade (muscular da mucosa espessada), seguimentos intestinais sem alterações	-	1,4
20	Fígado com ecogenicidade discretamente aumentada; rins com contornos e limites córtico-medulares pouco definidos, ecogenicidade discretamente elevada; bexiga, baço e próstata sem alterações; estômago com discreta repleção gasosa, paredes sem espessamento	-	3,2

5.2 Escore clínico de atividade da doença inflamatória intestinal crônica

No que se refere aos escores clínicos atribuídos pelos proprietários no momento da realização dos exames endoscópicos, o valor da mediana foi cinco com valores variando entre zero e 9. De acordo com a classificação proposta por Jergens (2003), seis animais apresentaram escore de doença insignificante clinicamente (0-3), sete animais com doença clinicamente leve (4-5), seis animais com índices de doença moderada (6-8) e um animal considerado com doença severa (9 ou +).

A grande variedade de graus de acometimento dos animais e valores de escore clínico levou a necessidade de analisarmos o grupo afetado de forma mais segmentada. Como descrito anteriormente, o grupo afetado foi subdividido em grupo afetado I (animais com escore insignificante ou leve, ou seja, com escores entre 0 e 5) e grupo afetado II (animais com escore moderado a severo, ou seja, com escores iguais ou superiores à 6). Esta subdivisão foi utilizada apenas para a realização de alguns testes estatísticos. Desta forma, 13 cães foram classificados como grupo afetado I enquanto que 7 como grupo afetado II.

5.3 Avaliação endoscópica dos animais

Dos 20 animais, nove foram submetidos a esofagogastroduodenoscopia (EGD) apenas, dois apenas a colonoscopia e nove submetidos a esofagogastroduodenoscopia (EGD) associado a colonoscopia. Nenhum animal exibiu qualquer tipo de complicação associada ao exame. Apenas três animais apresentaram alterações em esôfago sendo descrito hiperemia nos animais 7 e 16 e presença de estrias erosivas no animal 12. O cão n^{o} 11 mostrou diversas pigmentações puntiformes enegrecidas em todo o trajeto esofágico porem sem relevância clínica. Edema e hiperemia em diferentes intensidades foram observados em todos as cavidades gástricas avaliadas enquanto que presença de erosões/ulcerações foram diagnosticadas em quatro animais, variando entre erosões superficiais até ulcerações mais profundas. Dos 11 cães submetidos a procedimentos de colonoscopia, não foi possível em seis animais a introdução do

aparelho através do orifício íleo-cólico. Porções finais de íleo dos demais animais puderam ser diretamente avaliadas. Com exceção de um cão, todos os demais exibiram diferentes graus de edema e hiperemia em trajeto colônico sendo também relatada mucosa irregular, friável e com erosões/ulcerações. Sete animais apresentaram alterações na válvula íleo-cólica como hiperemia e erosões. Os dados referentes aos procedimentos endoscópicos de cada animal encontram-se no quadro 6. As figuras 2 e 3 ilustram as características observadas durante exames endoscópicos de animais do grupo afetado.

Quanto aos escores endoscópicos, foram atribuídas notas para o estômago de 18 animais, duodeno de 17 animais, enquanto que apenas 11 tiveram porções de cólon avaliadas segundo este critério. Dos 18 estômagos classificados, apenas um foi considerado normal (escore 0), enquanto que 13 receberam escore 1, dois receberam escore 2 e dois animal receberam escore 3. Da mesma semelhante, atribuiu-se escore correspondentes a alterações leves (escore 1) à maior parte das mucosas duodenais avaliadas (12 de 17 animais; 70,58%). Um cão ganhou escore 0 e três animais receberam escore 2. Nenhum cão recebeu escore 3. Na avaliação das mucosas colônicas, 45,45% dos animais foram classificados com escore 1 (n=5) enquanto que 18,18% receberam escore 2 e 27,27% obtiveram escore 3. Apenas uma amostra colônica foi considerada normal e recebeu escore 0. Em todos os segmentos avaliados, a mediana observada foi 1 com valores variando entre 0 e 3. Os dados referentes aos escores atribuídos a cada segmento avaliado bem como o escore máximo de cada cão encontram-se no quadro 7 e gráfico 2.

Quadro 6 – Descrição dos parâmetros endoscópicos dos pacientes - FMVZ/USP – São Paulo, 2012

Cão N°	EXAME REALIZADO	AVALIAÇÃO ENDOSCÓPICA	TESTE UREASE
1	Colono	Íleo não examinado; edema e hiperemia em válvula íleo-cólica; conteúdo fecal em grande quantidade dificultando avaliação detalhada do ceco, leve edema, moderada hiperemia em seg cólicos, reto normal	NR
2	EGD	Esôfago normal, pequena quantidade de secreção amarelada, moderado edema, hiperemia e erosões em corpo gástrico, múltiplas lesões hiperêmicas puntiformes em fundo gástrico e porção terço proximal de corpo gástrico; leve hiperemia em duodeno	POS
3	EGD	Esôfago normal, leve edema e hiperemia gástrica, moderada textura anormal em duodeno	NEG
4	EGD	Esôfago normal, leve edema em corpo gástrico, presença de prega gástrica longitudinal sobre piloro, porém pérvio; edema leve/moderado, textura anormal (granulosidade) e friável em duodeno	NEG
5	GD/Colono	Esôfago normal; hematina, conteúdo espumoso, leve edema e hiperemia em corpo gástrico, duodeno normal; íleo não examinado; moderado edema e leve hiperemia em válvula íleo-cólica, fezes e edema em ceco, leve edema em válvula ceco-cólica; moderado edema em cólon	POS
6	Colono	Íleo não examinado - não foi possível passagem do aparelho pela válvula íleo-cólica; edema, hiperemia e erosão em válvula íleo-cólica; moderado edema em ceco; moderado edema, hiperemia e múltiplas erosões puntiformes em válvula ceco-cólica; moderado edema, hiperemia e múltiplas erosões puntiformes em cólon, presença de muco em grande quantidade em cólon; severo edema e hiperemia em reto; severo edema, hiperemia em ânus com intenso sangramento à biopsia	NR
7	EGD	Leve dilatação esofágica em todo o trajeto com hiperemia da mucosa; estomago com conteúdo espumoso em grande quantidade, edema e hiperemia em corpo gástrico; edema e hiperemia em piloro lateralizado (porem pérvio); hiperemia e granulosidade em todo o trajeto duodenal avaliado	POS
8	EGD/Colono	Esôfago normal, edema e hiperemia em corpo gástrico, hematina em antro; leve hiperemia e granulosidade em duodeno; íleo normal; conteúdo fecal em ceco, edema e hiperemia em cólon transverso e descendente; edema, hiperemia e espessamento (aumento de volume) entre esfíncter anal externo e interno	NEG
9	EGD/Colono	Esôfago normal; edema leve a moderado em corpo gástrico, presença de hematina; leve eritema em duodeno; edema, hiperemia e erosão em íleo; edema, eritema e erosão em válvula íleo-cólica; edema, hiperemia e lesão erosiva linear em cólon (iatrogênico?); fezes em ceco; leve edema em reto	NEG
10	EGD	Esôfago normal; edema e hiperemia em estomago, piloro lateralizado porém pérvio; leve granulosidade, edema e friável em mucosa do duodeno	NEG
11	EGD	Diversas pigmentações puntiformes enegrecidas no esôfago, leve hiperemia gástrica, conteúdo espumoso, piloro completamente aberto (incompetência pilórica?anestésica?), duodeno normal	POS
12	EGD/Colono	Estrias erosivas longitudinais em porção final (terço distal) de esôfago, próximo a TGE-esofagite erosiva em terço final de esôfago; moderado edema e hiperemia em corpo gástrico, conteúdo mucoso e salivar em moderada a severa quantidade, múltiplos pequenos e superficiais pontos erosivos/ulcerosos em antro gástrico, piloro deformado (edema, friável e espessamento) porem foi possível à passagem do aparelho; duodeno com edema e hiperemia moderados além de erosões focais (leve); leve a moderado edema em íleo e válvula íleo-cólica; ceco normal; leve edema em válvula ceco-cólica; moderada hiperemia e edema, tecido friável leve em cólon.	NEG
13	EGD/Colono	Esôfago normal. Conteúdo espumoso, leve edema e hiperemia em corpo gástrico e antro; não foi possível a passagem do aparelho através do piloro (biopsia "cega") duodeno não examinado; íleo não examinado- impossível passagem do aparelho pelo orifício íleo-cólico; hiperemia focal em válvula íleo-cólica (hematoma?);ceco normal (conteúdo fecal);válvula ceco-cólica normal; cólon normal; leve edema em reto	POS
14	EGD/Colono	Esôfago normal; edema e hiperemia leves em corpo gástrico, duas erosões puntiformes com hematina em antro, erosões rasas hiperêmicas em corpo gástrico; leve hiperemia e granulosidade em duodeno; íleo e ceco não visualizados; edema moderado e hiperemia leve em todo o trajeto colônico	POS
15	EGD/Colono	Esôfago normal, secreção amarelada/esverdeada, edema e hiperemia em cavidade gástrica; granulosidade e hiperemia em duodeno; grande quantidade de conteúdo fecal dificultando a realização do exame; intenso edema, hiperemia, irregularidade e friável em todo trajeto colônico; íleo hiperêmico e friável	POS
16	EGD	Esôfago com leve hiperemia; edema e hiperemia moderados com cavidade gástrica com presença de ulceração em corpo gástrico; leve hiperemia em duodeno	NEG
17	EGD	Leve edema e hiperemia em cavidade gástrica; duodeno apresentando leve granulosidade e edema	NEG
18	EGD/Colono	Esôfago normal; inúmeros pontos hiperêmicos em fundo e terço anterior do corpo gástrico, edema em pregas gástricas, piloro edemaciado; bulbo duodenal/duodeno com leve granulosidade; íleo não visualizado porem realizada biópsia “cega”; inúmeros folículos linfóides em reto e cólon descendente, grande quantidade de conteúdo fecal dificultando a realização do exame; Erosão em transição íleo-cólica sangramento moderado durante realização de biópsias; ceco com grande quantidade de conteúdo fecal, apresentando leve hiperemia (ceco avaliado parcialmente, pois não foi possível passagem do aparelho porém orifício ceco-cólico aberto.	NEG
19	EGD/Colono	Esôfago normal. Edema leve e hiperemia moderada em corpo gástrico com presença de hematina; duodeno com edema e hiperemia leves a moderados além de vilosidades esbranquiçadas;discreto edema em íleo; moderado edema e moderado a severa hiperemia em todo trajeto colônico, tecido friável leve e leve erosão superficial em diversos pontos do trajeto. Irregularidade da mucosa, folículos linfóides, conteúdo fecal em grande quantidade associado a conteúdo de aspecto mucoso e fibrinóide dificultando a realização do exame	POS
20	EGD	Esôfago normal; edema e hiperemia em pregas do corpo gástrico, ausência de alterações em canal antral e fundo gástrico, piloro centrado e pérvio; duodeno com mucosa de aspecto granuloso leve e hiperemia leve	POS

EGD- esofagogastroduodenoscopia, Colono- colonoscopia, POS- positivo, NEG- negativo

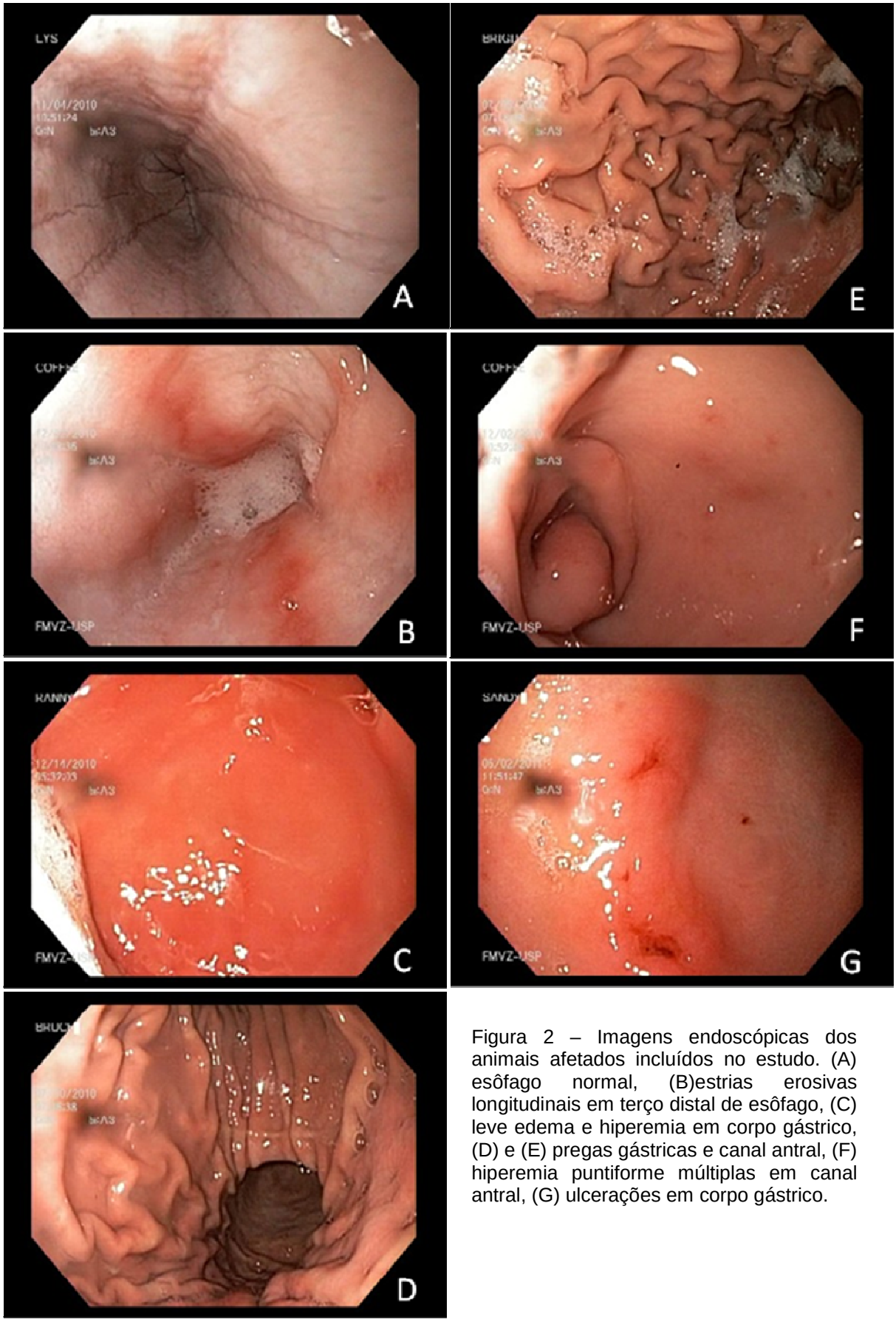


Figura 2 – Imagens endoscópicas dos animais afetados incluídos no estudo. (A) esôfago normal, (B)estrias erosivas longitudinais em terço distal de esôfago, (C) leve edema e hiperemia em corpo gástrico, (D) e (E) pregas gástricas e canal antral, (F) hiperemia puntiforme múltiplas em canal antral, (G) ulcerações em corpo gástrico.

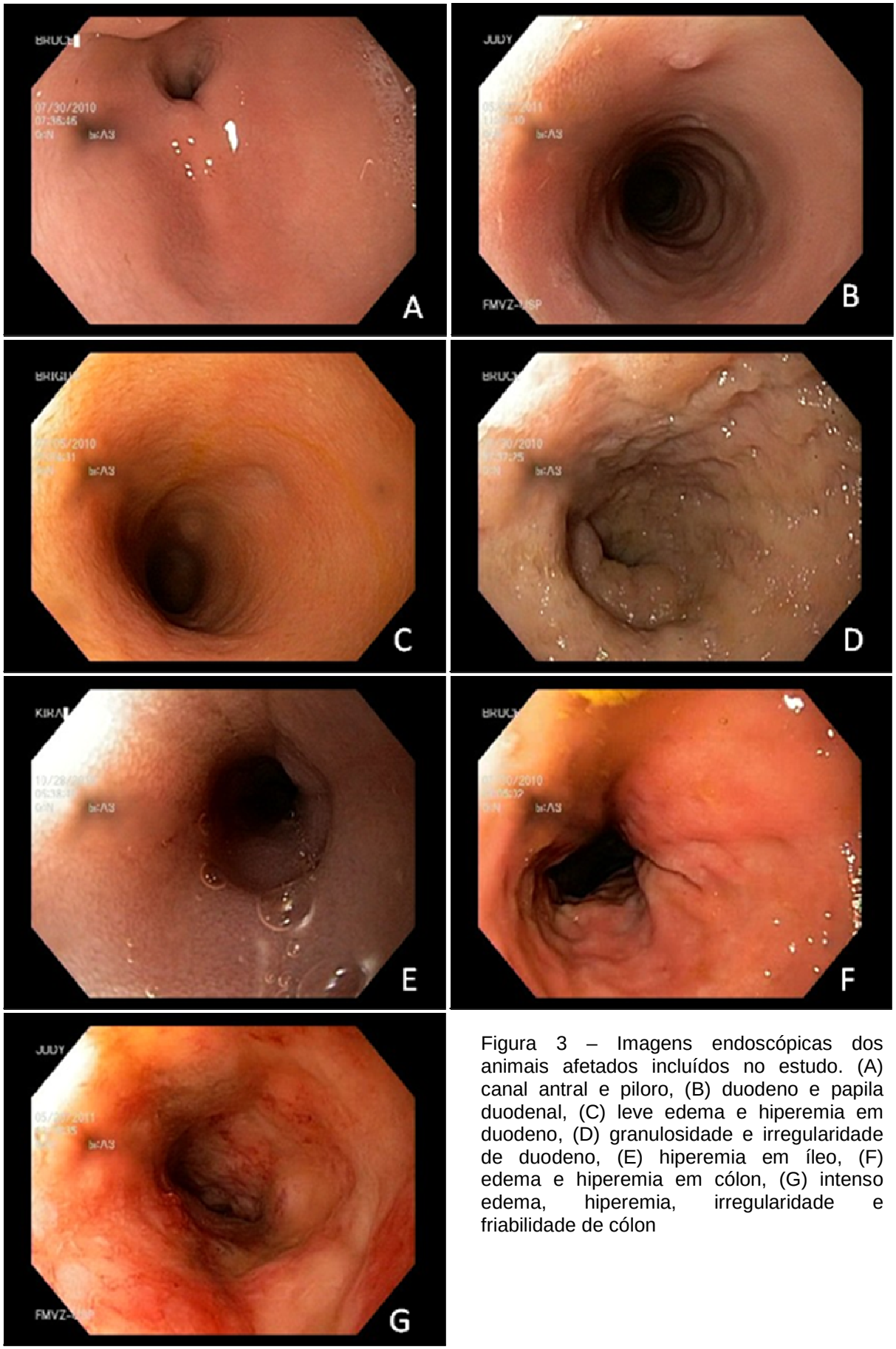


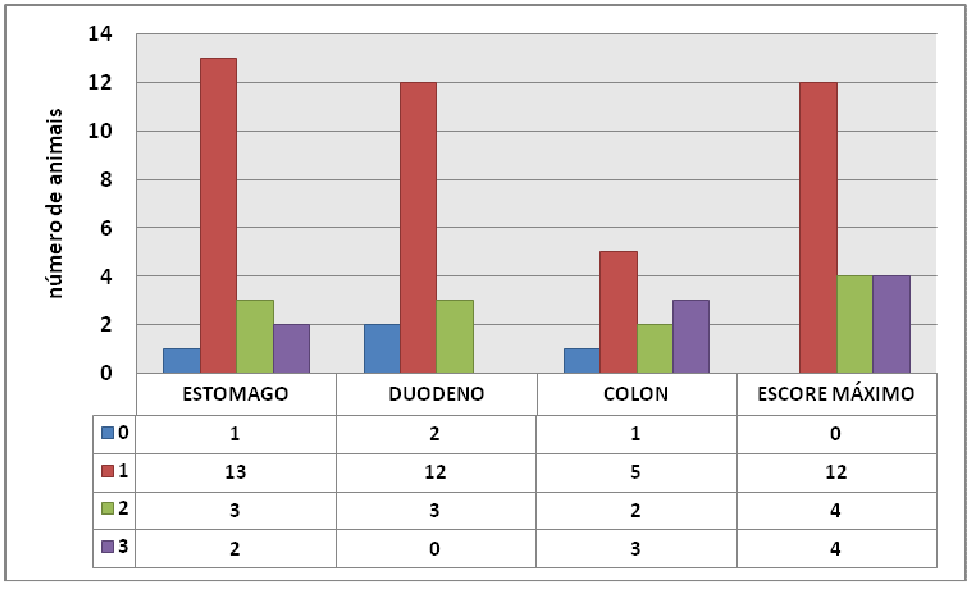
Figura 3 – Imagens endoscópicas dos animais afetados incluídos no estudo. (A) canal antral e piloro, (B) duodeno e papila duodenal, (C) leve edema e hiperemia em duodeno, (D) granulosidade e irregularidade de duodeno, (E) hiperemia em íleo, (F) edema e hiperemia em cólon, (G) intenso edema, hiperemia, irregularidade e friabilidade de cólon

Quadro 7 – Descrição dos escores endoscópicos atribuídos aos animais do grupo afetado - FMVZ/USP – São Paulo – 2012

	ESTOMAGO	DUODENO	COLON	ESCORE MÁXIMO
1	NA	NA	1	1
2	3	1	NA	3
3	1	1	NA	1
4	0	2	NA	2
5	1	0	1	1
6	NA	NA	3	3
7	1	1	NA	1
8	1	1	1	1
9	1	1	1	1
10	1	1	NA	1
11	1	0	NA	1
12	2	2	2	2
13	1	NA	0	1
14	1	1	1	1
15	1	1	3	3
16	3	1	NA	2
17	1	1	NA	1
18	1	1	2	2
19	2	2	3	3
20	1	1	NA	1

NA: não atribuído

Gráfico 2 – Representação gráfica da distribuição do escore endoscópico nos diferentes segmentos avaliados - FMVZ/USP – São Paulo – 2012



5.4 Avaliação histopatológica das biópsias endoscópicas

5.4.1 Avaliação histopatológica inicial

Dos 20 animais incluídos no estudo, 18 foram avaliados por procedimentos de esofagogastroduodenoscopia e 11 por colonoscopia.

Nos animais avaliados por esofagogastroduodenoscopia, apenas três dos 18 (16,66%) tiveram a mucosa gástrica classificada como normal/sem alterações. A identificação de organismos do gênero *Helicobacter spp*. foi detectada em apenas três animais. Neste mesmo grupo de animais, 16 dos 18 apresentaram diferentes graus de enterite linfocítica plasmocítica, o que significa 88,88% dos fragmentos avaliados. Destes 16, seis mostravam a participação de eosinófilos no processo inflamatório de forma coadjuvante. Em um destes animais, observou-se a presença de histiócitos associada à inflamação linfocítica plasmocítica. Apenas um cão teve suas biópsias consideradas insuficientes para análise. As descrições das avaliações histopatológicas iniciais de cada animal encontram-se no apêndice A.

5.4.2 Avaliação histopatológica segundo padronização da WSAVA

As análises histopatológicas foram realizadas com o auxílio do Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias, docente do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e colaborador deste projeto de pesquisa e baseiam-se na classificação proposta pela *World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group* (WSAVA). Para fins de visualização dos resultados, os dados estão descritos nos quadros 8, 9, 10 e 11; tabelas 1, 2 e 3 e gráficos 3, 4, 5 e 6. As figuras 4 a 23 ilustram os parâmetros histopatológicos estudados.

Os parâmetros analisados diferem para cada segmento, sendo que todos incluem avaliações quanto à integridade da superfície epitelial, alterações de criptas, presença de fibrose e tipos de células inflamatórias presentes. Para a

homogeneidade da avaliação, optou-se por trabalhar todas as amostras de um mesmo segmento conjuntamente. Todas as amostras de estômago (17 amostras), duodeno (15 amostras) e cólon (11 amostras) foram avaliadas e classificadas. A avaliação das biopsias de íleo foram realizadas de forma descritiva e independente das demais pois a padronização proposta pela *World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group* (Quadro 11). A WSAVA não realizou em sua proposta a avaliação do íleo.

No que se refere às avaliações de mucosa gástrica em região de corpo gástrico, quatro amostras foram classificados como mucosas normais, 12 animais com processos inflamatórios do tipo linfoplasmocitários e apenas um cão apresentou lesão não inflamatória (atrofia/fibrose). Embora não fossem parâmetros padronizados, edema, congestão e hemorragia foram freqüentemente observados. Apenas dois animais tiveram amostras de antro gástrico avaliadas, sendo que o diagnóstico para este segmento foi igual ao definido para o corpo gástrico em ambos os animais (gastrite linfoplasmocítica para o cão n^{o}3 e gastrite linfoplasmocítica severa para o n^{o}16). A avaliação contemplou 9 parâmetros, totalizando 153 notas. Destas, 103 foram consideradas normais (67,32%), 42 leves (27,45%), 6 moderadas (3,92%), 0 severa (0%) e duas não puderam receber notas (1,30%) uma vez que a representação do tecido não permitia a avaliação de determinado parâmetro. O escore atribuído à avaliação do estômago variou entre 0 e 9, com mediana de 3,0.

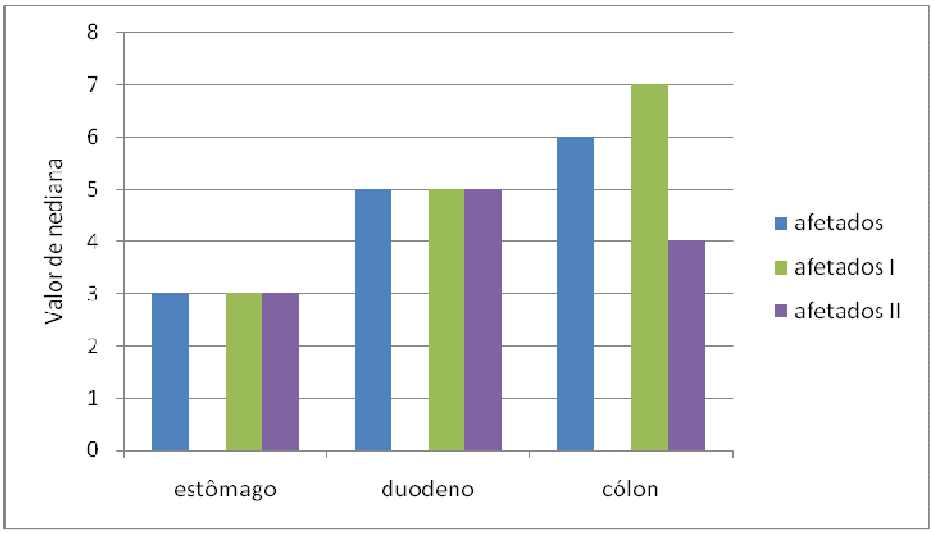
Quanto à análise de fragmentos duodenais, houve predomínio de lesões inflamatórias do tipo linfoplasmocítica (9 dos 15 animais avaliados). Em dois destes cães, havia a participação de outro tipo celular, embora o predomínio fosse linfoplasmocítico (um com a participação de eosinófilos e outro, neutrófilos). Dois cães receberam o diagnóstico de enterite neutrofílica e dois, de processos inflamatórios mistos (participação de eosinófilos, linfócitos e neutrófilos sem o predomínio de um tipo celular). Um cão foi diagnosticado com processo não inflamatório (atrofia/fibrose) e outro considerado normal para os parâmetros avaliados. A avaliação contemplou 10 parâmetros avaliados, totalizando 150 notas. Destas, 83 foram consideradas normais (55,33%), 54 leves (36,00%), 7 moderadas (4,66%), 2 severas (1,33%) e 4 não puderam receber notas (2,66%). Similarmente ao escore observado para a avaliação gástrica, as notas atribuídas às amostras duodenais variaram entre 0 e 9 e apresentaram mediana de 5,0.

Amostras colônicas de 11 animais foram analisadas sendo que nove destes apresentaram processos linfoplasmocíticos e um mostrou processo inflamatório predominantemente eosinofílico. Apenas um cão exibiu processo não inflamatório (atrofia/fibrose). A avaliação contemplou 8 parâmetros, totalizando 88 notas. Destas, 34 foram consideradas normais (38,63%), 40 leves (45,45%), 14 moderadas (15,90%), 0 severa (0%) e 0 não puderam receber notas (0%). Os escores atribuídos ao cólon variou entre 3 e 10, e apresentou mediana de 6,0.

A mediana do escore do cólon foi superior a mediana do duodeno e estômago (6,0; 5,0 e 3,0 respectivamente). O gráfico 3 se refere às medianas encontradas nos subgrupos, sendo:

- no estômago, 3,0 para afetado I e 3,0 para afetado II.
- no duodeno, 5,0 para afetado I e 5,0 para afetado II.
- no cólon, 7,0 para afetado I e 4,0 para afetado II.

Gráfico 3 – Representação gráfica do valor de mediana em cada grupo, nos diferentes segmentos avaliados – FMVZ/USP – São Paulo – 2012



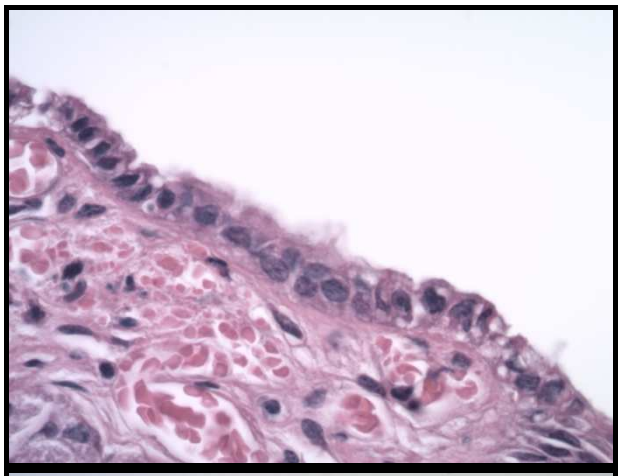


Figura 4 – Fotomicrografia de corte histológico de estômago do cão n°13. Segmento de corpo gástrico apresentando injúria epitelial moderada (escore 2), com rasamento e degeneração do epitélio colunar. HE, aumento de 400x.

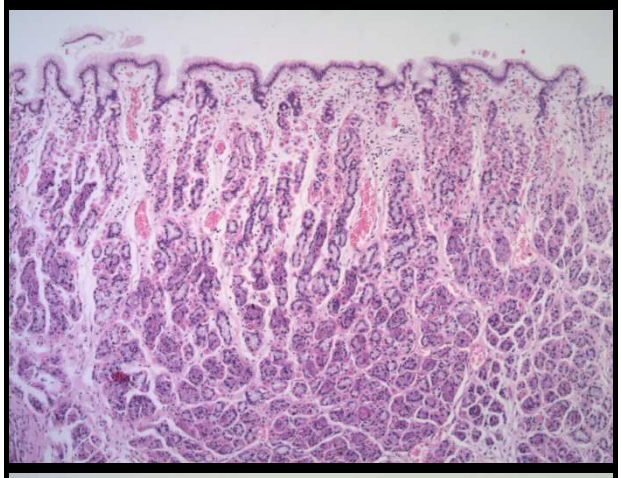


Figura 5 – Fotomicrografia de corte histológico de estômago do cão n° 20. O corte representa segmento de corpo gástrico com congestão, edema e esgarçamento da lâmina própria. HE, aumento de 100x.

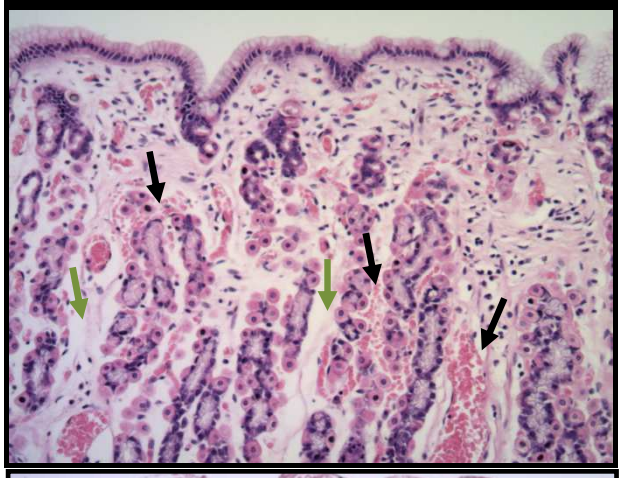


Figura 6 – Fotomicrografia de corte histológico de estômago do cão n° 20. Detalhe da imagem anterior evidenciando os processos de congestão (setas pretas), edema e esgarçamento (setas verdes) da lâmina própria. HE, aumento de 200x.

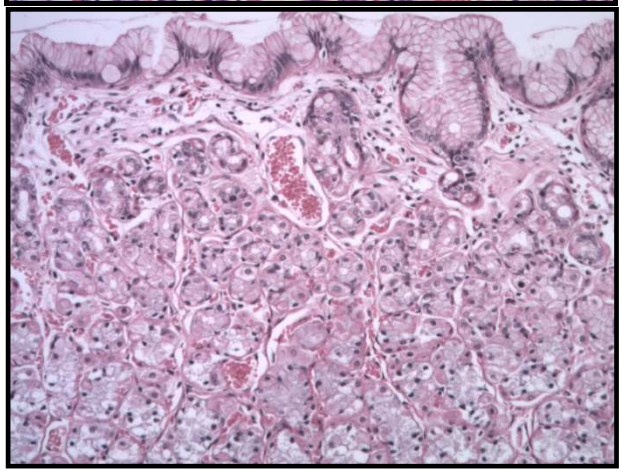


Figura 7 – Fotomicrografia de corte histológico de estômago do cão n° 7. O corte representa corpo gástrico com congestão e edema além de discreta injúria epitelial da superfície e das fossetas gástricas (escore 1 para ambos). HE, aumento de 100x.

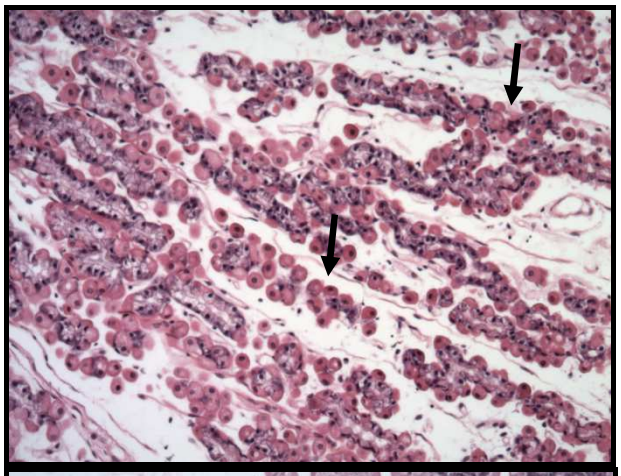


Figura 8 – Fotomicrografia de corte histológico de estômago do cão n° 19 representando segmento de corpo gástrico. Note a discreta atrofia de mucosa com segmentação do tecido glandular (“ninhos glandulares”) como apontada nas setas. HE, aumento de 200x.

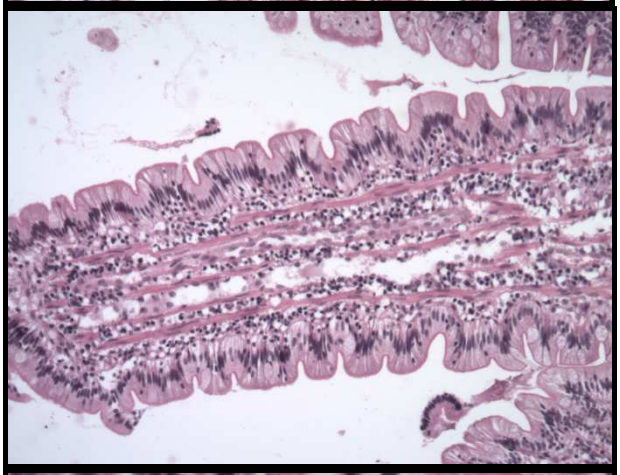


Figura 9 – Fotomicrografia de corte histológico de duodeno do cão n° 2. O corte representa vilo com superfície epitelial normal (escore 0), ausência de achatamento ou atrofia de vilosidade (escore 0), canal linfático de calibre normal (escore 0), aumento discreto do número de linfócitos intraepiteliais (escore1), discreta quantidade de linfócitos e plasmócitos em lâmina própria. HE, aumento de 100x.

Figura 10 – Fotomicrografia de corte histológico de duodeno do cão n° 2. Observe discreta quantidade de linfócitos intraepiteliais como apontado nas setas (escore 1) e ausência de injúria epitelial em vilo. HE, aumento de 400x.

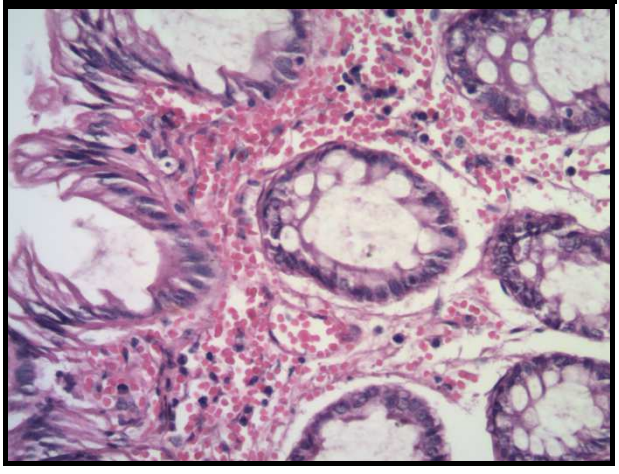


Figura 11 – Fotomicrografia de corte histológico de duodeno do cão n° 13 exibindo congestão em lâmina própria. HE, aumento de 200x.

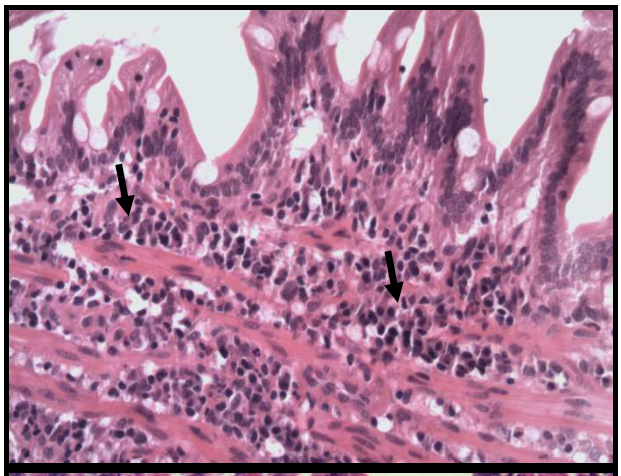


Figura 12 – Fotomicrografia de corte histológico de duodeno do cão n° 19, evidenciando infiltração linfoplasmocítica moderada indicada pelas setas (escore 2). HE, aumento de 200x.

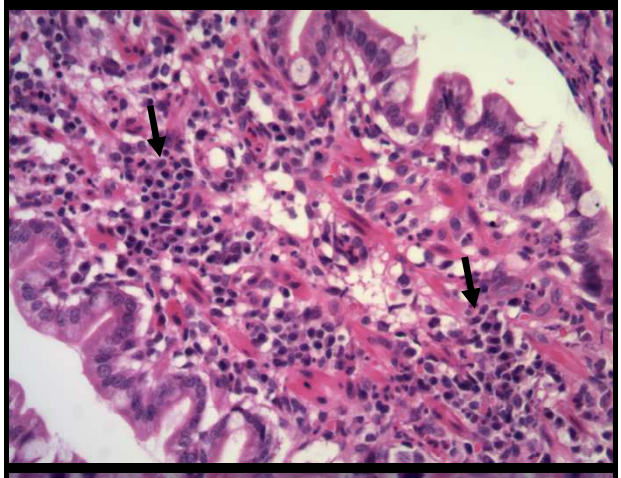


Figura 13 – Fotomicrografia de corte histológico de duodeno do cão n° 15. Observe a marcante infiltração neutrofílica (escore 3) indicada pelas setas. HE, aumento de 200x.

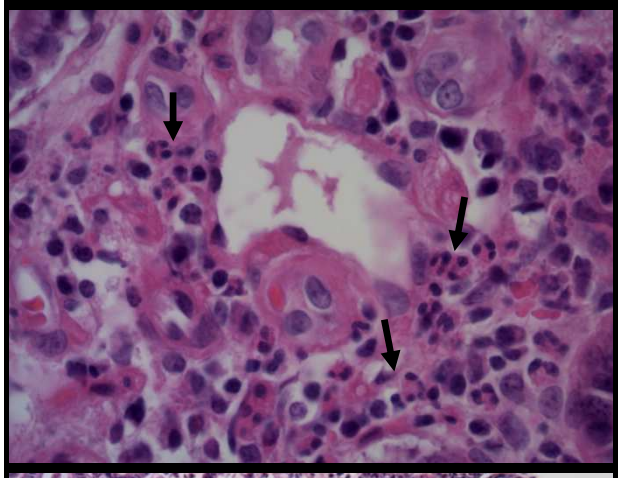


Figura 14 – Fotomicrografia de corte histológico de duodeno do cão n° 15. Note, em maior aumento, as características do infiltrado neutrofílico marcante como apontam as setas (escore 3). HE, aumento de 400x.

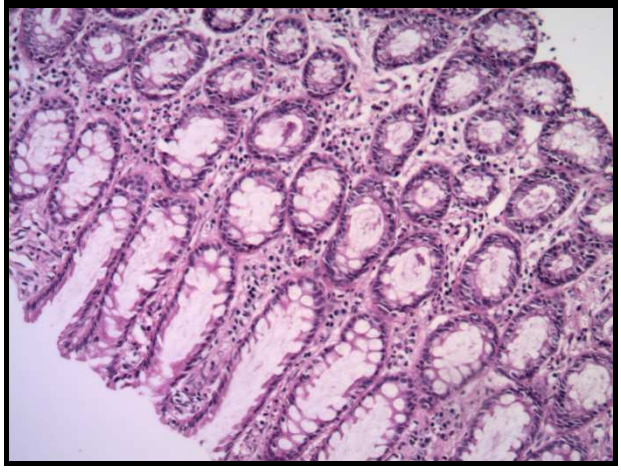


Figura 15 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n° 5. Observe o padrão morfológico de normalidade do revestimento epitelial e da arquitetura das criptas. HE, aumento de 100x.

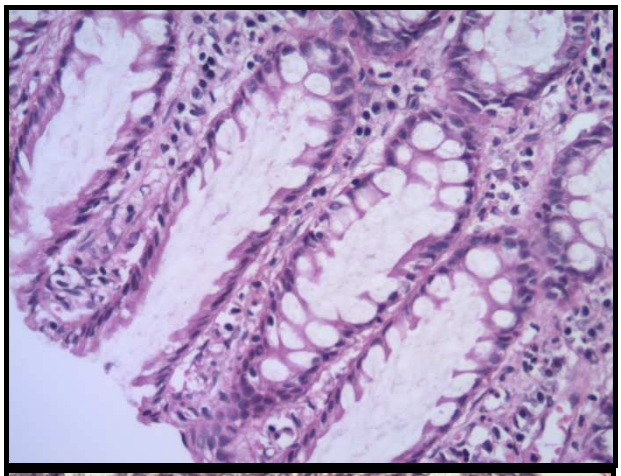


Figura 16 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n° 5. Note, em maior aumento, o padrão normal das criptas e a presença de moderado úmero de eosinófilos em lâmina prórpia. HE, aumento de 200x.

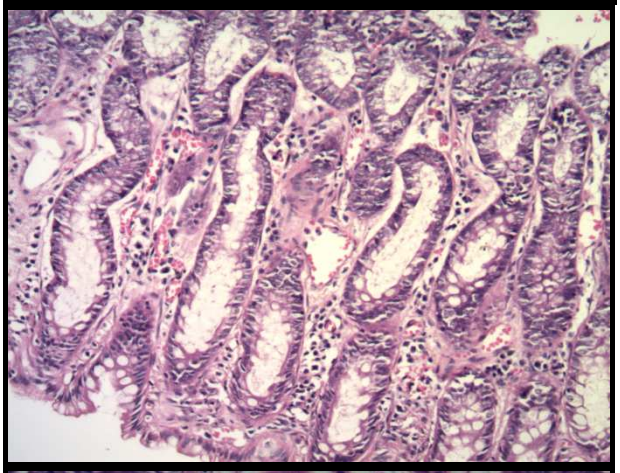


Figura 17 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n° 13. Figura apresentando discretas hiperplasia e dilatação/distorção de criptas, associado a discreto infiltrado inflamatório linfoplasmocítico. HE, aumento de 100x.

Figura 18 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n° 13. Observe em maior aumento os processos discretos de hiperplasia e dilatação/distorção criptais. HE, aumento de 200x.

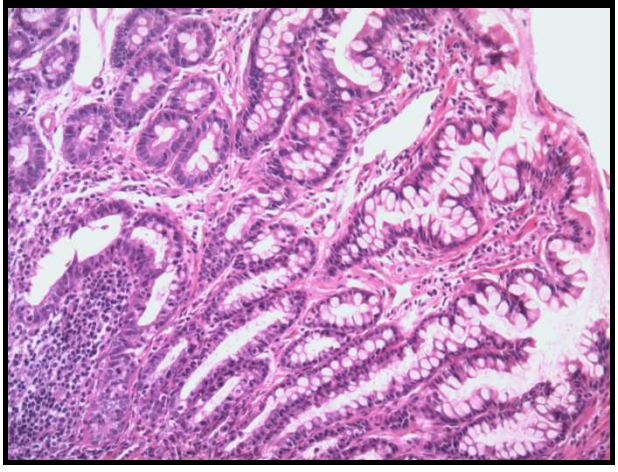


Figura 19 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n° 15. Note discretas hiperplasia e dilatação/distorção de criptas, associados à sutil injúria da superfície epitelial. HE, aumento de 100x.

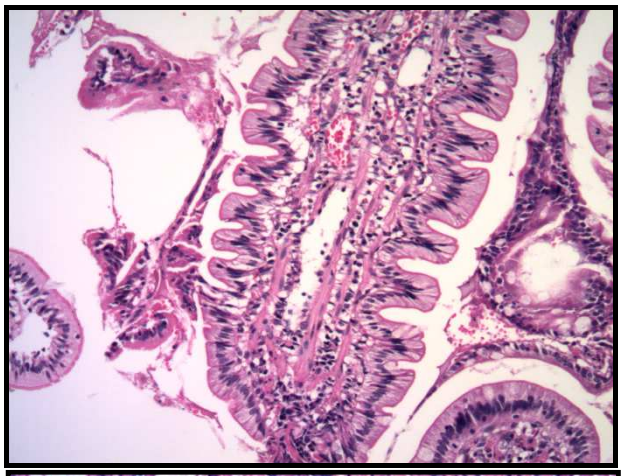


Figura 20 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n° 5. Note a linfangectasia discreta associada a presença de infiltrado predominantemente mononuclear. HE, aumento de 100x.

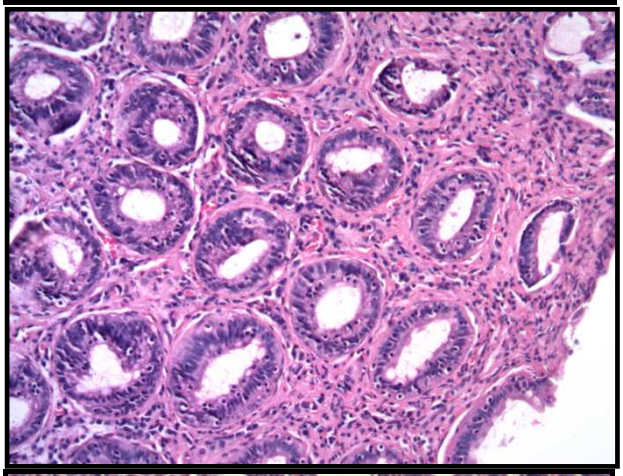


Figura 21 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n° 8. Destaque para a presença de moderadas fibrose e infiltração mononuclear. HE, aumento de 100x.

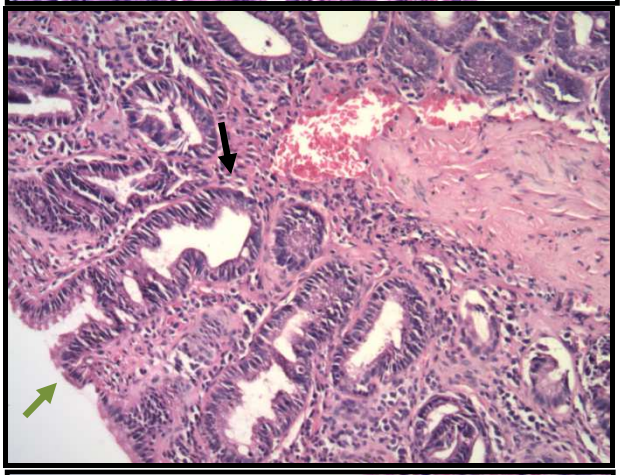


Figura 22 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n° 8. Injúria moderada da superfície epitelial (seta verde), hiperplasia discreta e dilatação/distorção moderada de criptas (seta preta), associadas a moderadas fibrose e infiltração linfoplasmocítica. HE, aumento de 100x.

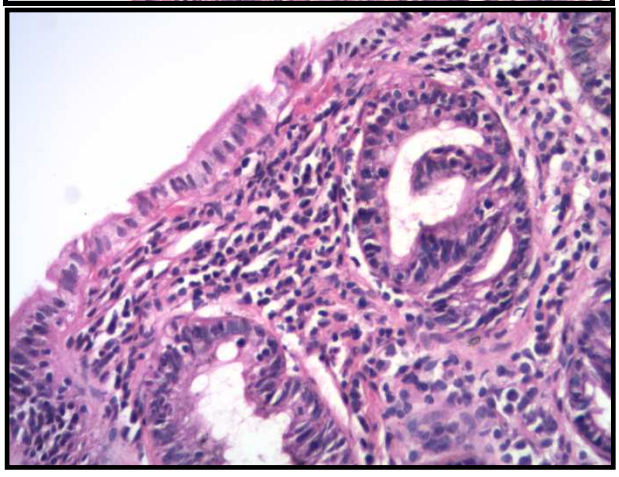


Figura 23 – Fotomicrografia de corte histológico de cólon do cão n°8. Figura apresentando injúria da superfície epitelial moderada (escore 2) e infiltrado inflamatório mononuclear moderado. HE, aumento de 200x.

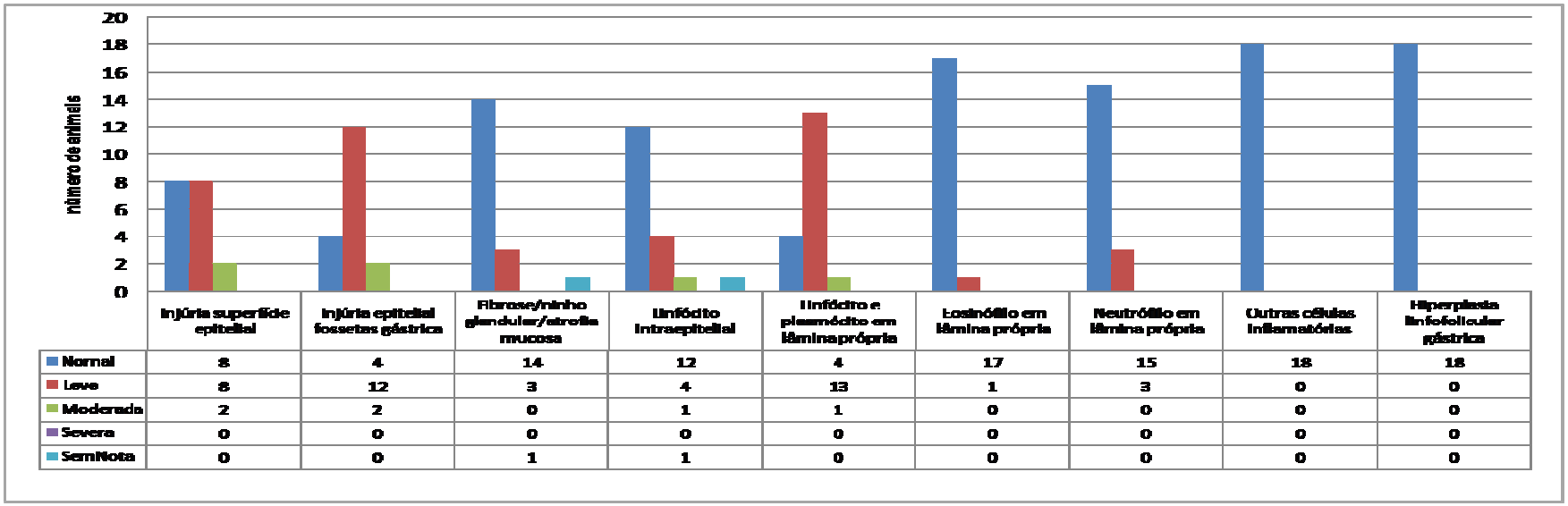
Quadro 8 - Descrição dos parâmetros histopatológicos de fragmentos gástricos dos animais do grupo afetado – FMVZ/USP – São Paulo, 2012

	Cão Nº	Injúria superfície epitelial	Injúria epitelial fossetas gástrica	Fibrose/ninho glandular /atrofia mucosa	Linfócitos intraepiteliais	Linfócito e plasmócito em lâmina própria	Eosinófilo em lâmina própria	Neutrófilo em lâmina própria	Outras células inflamatórias	Hiperplasia linfofolicular gástrica	Diagnóstico final	Outros comentários	Escore
Mucosa gástrica (corpo gástrico)	1	não se aplica											-
	2	normal	normal	Normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal		0
	3	leve	leve	Normal	normal	leve	leve	normal	normal	normal	LØPØ		4
	4	normal	leve	Normal	leve	normal	normal	normal	normal	normal	normal		2
	5	normal	leve	Normal	normal	normal	normal	leve	normal	normal	normal		2
	6	não se aplica											-
	7	leve	leve	Normal	normal	leve	normal	normal	normal	normal	LØPØ		3
	8	leve	leve	Normal	normal	leve	normal	normal	normal	normal	LØPØ		3
	9	normal	normal	Normal	normal	leve	normal	normal	normal	normal	LØPØ discreta	edema, congestão	1
	10	leve	normal	Normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	edema, congestão, hemorragia focal	1
	11	leve	leve	sem nota atribuída	normal	leve	normal	normal	normal	normal	LØPØ	aberto para atrofia	3*
	12	leve	leve	Leve	normal	leve	normal	normal	normal	normal	LØPØ + fibrose	hiperplasia glandular, congestão	4
	13	moderado	moderado	Leve	sem nota atribuída	leve	normal	normal	normal	normal	não inflamatório atrofia/ fibrose	congestão, fibrose	6*
	14	normal	normal	Normal	leve	leve	normal	normal	normal	normal	LØPØ discreta	congestão discreta	2
	15	leve	leve	Normal	leve	leve	normal	normal	normal	normal	LØPØ		4
	16	moderado	moderado	Normal	moderado	moderado	normal	leve	normal	normal	LØPØ severo	restos celulares, micro abcessos	9
	17	normal	leve	Normal	normal	leve	normal	normal	normal	normal	LØPØ	congestão, edema, esgarçamento	2
	18	normal	leve	Normal	normal	leve	normal	leve	normal	normal	LØPØ	congestão, esgarçamento	3
	19	leve	leve	Leve	leve	leve	normal	normal	normal	normal	LØPØ + atrofia/fibrose	congestão edema, hemorragia	5
	20	normal	leve	Normal	normal	leve	normal	normal	normal	normal	LØPØ	edema, congestão esgarçamento	2

Tabela 1 – Distribuição do grau de alteração histopatológica dos fragmentos de mucosa gástrica dos cães acometidos – FMVZ/USP – São Paulo – 2012

Alteração	Injúria superfície epitelial %	Injúria epitelial fossetas gástrica %	Fibrose/ ninho glandular/ atrofia mucosa %	Linfócito intraepitelial %	Linfócito e plasmócito em lâmina própria %	Eosinófilo em lâmina própria %	Neutrófilo em lâmina própria%	Outras células inflamatórias%	Hiperplasia linfofolicular gástrica%
Normal	44,44(8)	22,22(4)	77,79(14)	66,68(12)	22,22(4)	94,45(17)	83,34(15)	100(18)	100(18)
Leve	44,44(8)	66,66(12)	16,66(3)	22,22(4)	72,23(13)	5,55(1)	16,66(3)	0(0)	0(0)
Moderada	11,12(2)	11,12(2)	0(0)	5,55(1)	5,55(1)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Severa	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Sem Nota	0(0)	0(0)	5,55(1)	5,55(1)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Total	100(18)	100(18)	100(18)	100(18)	100(18)	100(18)	100(18)	100(18)	100(18)

Gráfico 4 – Representação gráfica da distribuição do grau de alteração histopatológica dos fragmentos de mucosa gástrica dos cães acometidos – FMVZ/USP – São Paulo – 2012



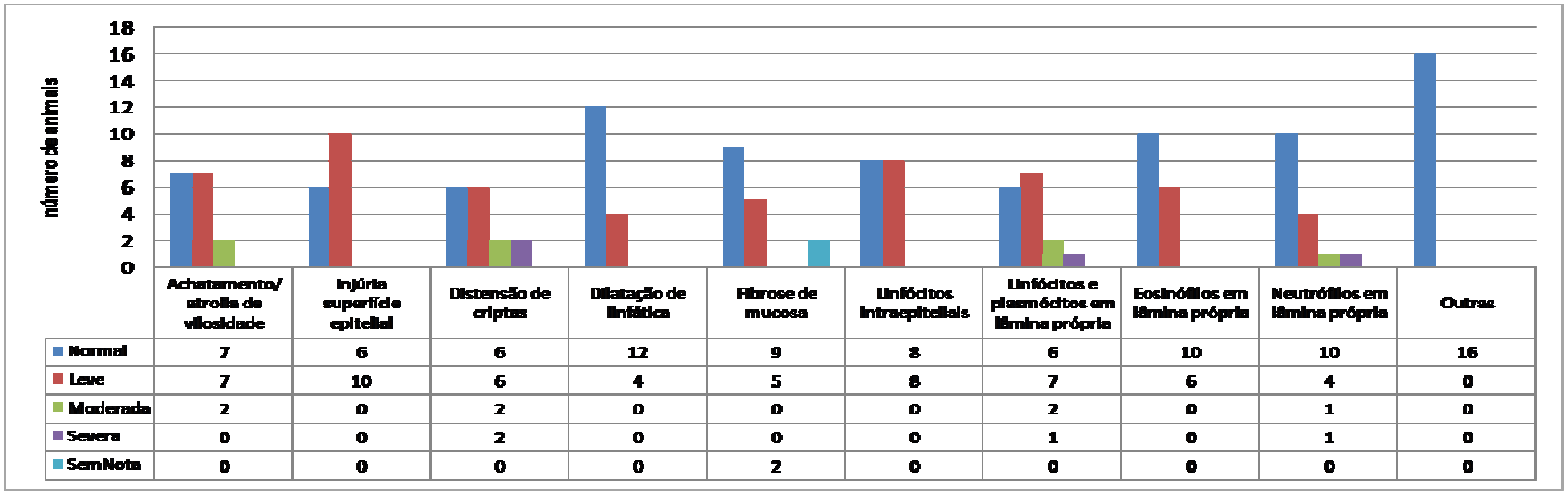
Quadro 9 – Descrição dos parâmentros histopatológicos de fragmentação duodenais dos animais do grupo afetado – FMVZ/USP – São Paulo - 2012

	Cão Nº	Achatamento /atrofia de vilosidade	Injúria superfície epitelial	Distensão de criptas	Dilatação de linfática	Fibrose de mucosa	Linfócito intraepiteliais	Linfócito e plasmócito em lâmina própria	Eosinófilos em lâmina própria	Neutrófilos em lâmina própria	Outras	Diagnóstico final		Escore
Mucosa duodenal	1	Não se aplica												-
	2	normal	normal	leve	normal	normal	leve	leve	normal	normal	normal	LØPØ		3
	3	leve	leve	moderada	normal	leve	leve	normal	leve	leve	normal	NØ		8
	4	leve	leve	leve	normal	leve	leve	normal	normal	normal	normal	LØPØ		5
	5	leve	normal	normal	leve	leve	leve	normal	normal	leve	normal	LØPØ		5
	6	Não se aplica												-
	7	leve	normal	normal	normal	leve	normal	Leve	leve	normal	normal	LØPØ		4
	8	moderado	leve	leve	normal	leve	normal	normal	normal	normal	normal	Não inflamatório, atrofia/fibrose		5
	9	normal	normal	normal	leve	normal	leve	leve	leve	leve	normal	Processo inflamatório misto (E, L, N)		5
	10	normal	normal	Sem nota atribuída	normal	Sem nota atribuída	normal	normal	normal	normal	normal	normal		0*
	11	Material perdido durante processamento histopatológico												-
	12	moderado	leve	moderado	leve	normal	normal	leve	leve	leve	normal	Processo inflamatório misto (E, L, N) + linfangectasia		9
	13	leve	leve	Sem nota atribuída	normal	Sem nota atribuída	normal	leve	normal	normal	normal	LØPØ+atrofia de vilo		3*
	14	leve	leve	normal	normal	normal	normal	leve	leve	normal	normal	LØPØ + EØ		4
	15	leve	leve	leve	normal	normal	normal	normal	normal	severa	normal	NØ		6
	16	normal	leve	leve	normal	normal	leve	severo	normal	normal	normal	LØPØ	Congestão, edema submucosa	6
	17	normal	leve	normal	Leve	normal	normal	moderada	leve	normal	normal	LØPØ		5
	18	Material perdido durante processamento histopatológico												-
	19	normal	normal	leve	normal	normal	leve	moderada	normal	moderada	normal	LØPØ + NØ	Micro abscedação criptal	6
	20	normal	leve	normal	normal	normal	leve	leve	normal	normal	normal	LØPØ		3

Tabela 2 – Distribuição do grau de alteração histopatológica dos fragmentos de mucosa duodenal dos cães acometidos – FMVZ/USP – São Paulo – 2012

Alteração	Achatamento /atrofia de vilosidade%	Injúria superfície epitelial%	Distensão de criptas%	Dilatação de linfática%	Fibrose de mucosa%	Linfócitos intraepiteliais%	Linfócitos e plasmócitos em lâmina própria%	Eosinófilos em lâmina própria%	Neutrófilos em lâmina própria%	Outras%
Normal	43,75(7)	37,50(6)	37,50(6)	75,00(12)	56,25(9)	50,00(8)	37,50(6)	62,50(10)	62,50(10)	100(16)
Leve	43,75(7)	62,50(10)	37,50(6)	25,00(4)	31,25(5)	50,00(8)	43,75(7)	37,50(6)	25,00(4)	0(0)
Moderada	12,50(2)	0(0)	12,50(2)	0(0)	0(0)	0(0)	12,50(2)	0(0)	6,25(1)	0(0)
Severa	0(0)	0(0)	12,50(2)	0(0)	0(0)	0(0)	6,25(1)	0(0)	6,25(1)	0(0)
Sem Nota	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	12,50(2)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Total	100(16)	100(16)	100(16)	100(16)	100(16)	100(16)	100(16)	100(16)	100(16)	100(16)

Gráfico 5 – Representação gráfica da distribuição do grau de alteração histopatológica dos fragmentos de mucosa duodenal dos cães acometidos – FMVZ/USP – São Paulo – 2012



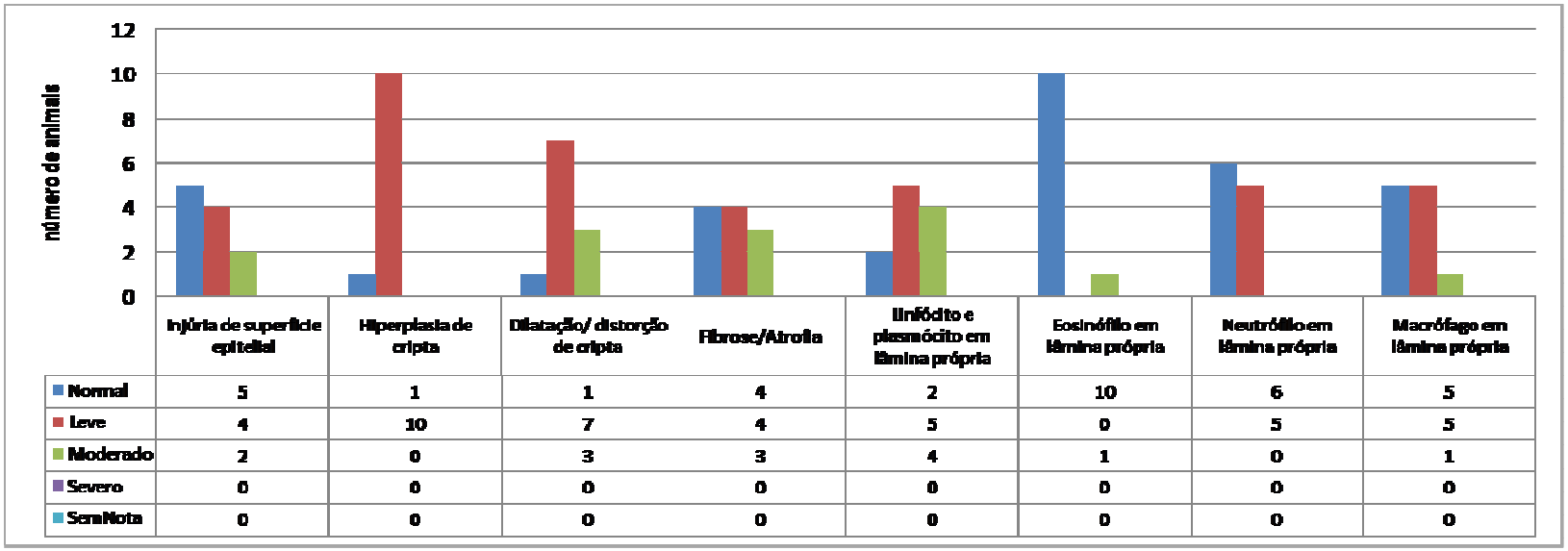
Quadro 10 – Descrição dos parâmetros histopatológicos de fragmentos colônicos dos animais do grupo afetado – FMVZ/USP – São Paulo – 2012

	Cão Nº	Injúria de superfície epitelial	Hiperplasia de cripta	Dilatação/ distorção de cripta	Fibrose/ atrofia	Linfócito e plasmócito em lâmina própria	Eosinófilo em lâmina própria	Neutrófilo em lâmina própria	Macrófago em lâmina própria	Diagnóstico final	Outros comentários	escore
Mucosa colônica	1	leve	leve	moderada	moderada	moderada	normal	leve	leve	LØPØ		10
	2	não se aplica										-
	3	não se aplica										-
	4	não se aplica										-
	5	normal	normal	normal	normal	normal	moderado	leve	normal	EØ		3
	6	leve	leve	leve	moderada	leve	normal	leve	leve	LØPØ		8
	7	não se aplica										-
	8	moderado	leve	moderada	moderada	moderada	normal	normal	leve	LØPØ	PI crônico ativo, ulceração, dilatação distorção criptal	10
	9	normal	leve	moderada	leve	moderada	normal	normal	leve	LØPØ		7
	10	não se aplica										-
	11	não se aplica										-
	12	normal	leve	leve	leve	leve	normal	leve	normal	LØPØ	Material inadequado	5
	13	leve	leve	leve	leve	leve	normal	normal	leve	LØPØ	Hiperplasia, linfocitólise moderada de agregados linfóides e hemorragia focal coalescente discreta a moderada	6
	14	normal	leve	leve	leve	normal	normal	normal	normal	não inflamatória atrofia/fibrose		3
	15	leve	leve	leve	normal	leve	normal	leve	normal	LØPØ		5
	16	não se aplica										-
	17	não se aplica										-
	18	moderado	leve	leve	normal	moderada	normal	normal	moderado	LØPØ	lesão focalmente extensiva mononuclear (L, Mo, P), congestão	8
	19	Normal	leve	leve	normal	leve	normal	normal	Normal	LØPØ		3
	20	não se aplica										-

Tabela 3 – Distribuição do grau de alteração histopatológica dos fragmentos de mucosa colônica dos cães acometidos – FMVZ/USP – São Paulo – 2012

Alteração	Injúria de superfície epitelial%	Hiperplasia de cripta%	Dilatação/distorção de cripta%	Fibrose/ atrofia%	Linfócito e plasmócito em lâmina própria%	Eosinófilo em lâmina própria%	Neutrófilo em lâmina própria%	Macrófago em lâmina própria%
Normal	45,45(5)	9,10(1)	9,10(1)	36,36(4)	18,19(2)	90,90(10)	54,55(6)	45,45(5)
Leve	36,36(4)	90,90(10)	63,63(7)	36,36(4)	45,45(5)	0(0)	45,45(5)	45,45(5)
Moderado	18,19(2)	0(0)	27,27(3)	27,27(3)	36,36(4)	9,10(1)	0(0)	9,10(1)
Severo	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Sem Nota	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Total	100(11)	100(11)	100(11)	100(11)	100(11)	100(11)	100(11)	100(11)

Gráfico 6 – Representação gráfica da distribuição do grau de alteração histopatológica dos fragmentos de mucosa colônica dos cães acometidos – FMVZ/USP – São Paulo – 2012



Quadro 11 – Descrição dos parâmetros histopatológicos de fragmentos de íleo dos animais do grupo afetado – FMVZ/USP – São Paulo – 2012

Cão	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO ÍLEO
1	Epitélio íntegro; ausência de granulócitos; menos do 10 linfócitos transmembrânicos em aumento de 40x;10-15% da lâmina própria do vilo ocupada por linfócitos; ausência de agregado linfóide; 25-50% do epitélio ocupado por células caliciformes; 15-20% do canal linfático ocupando cerca de % da largura da lâmina própria do vilo.
2	NR
3	NR
4	NR
5	Epitélio preservado; raros granulócitos; menos de 10 linfócitos transmembrânico em aumento de 40x; 5-10% da lâmina própria do vilo ocupada por linfócitos; ausência de agregado linfóide; mais de 75% do epitélio ocupado por células caliciformes; canal linfático ocupando cerca de 20-30% da largura da lâmina própria do vilo.
6	Epitélio comprometido (atenuação epitelial); ausência de granulócitos; 10 a 25 linfócitos transmembrânico em aumento de 40x; 25-30% da lâmina própria do vilo ocupada por linfócitos; presença de agregado linfóide expansivo com evidência de hiperplasia linfóide; 50-75% do epitélio ocupado por células caliciformes, canal linfático ocupando cerca de 20-30% da largura da lâmina própria do vilo.
7	NR
8	Epitélio comprometido (atenuação epitelial); ausência de granulócitos; 10-25 linfócitos transmembrânico em aumento de 40x; 25-30% da lâmina própria do vilo ocupada por linfócitos; presença de agregado linfóide em numero adequado, sem evidência de reatividade; 50-75% do epitélio ocupado por células caliciformes; canal linfático ocupando cerca de 25% da largura da lâmina própria do vilo; vilosidade com discreta congestão.
9	Epitélio comprometido (atenuação epitelial); quantidade superior a 10 granulócitos por campo de 40x; menos de 10 linfócitos transmembrânico em aumento de 40x; cerca de 30% da lâmina própria do vilo ocupada por linfócitos; ausência de agregado linfóide; 25-50% do epitélio ocupado por células caliciformes; canal linfático ocupando cerca de 50-75% da largura da lâmina própria do vilo; vilosidade com discreta congestão.
10	NR
11	NR
12	NR
13	Íleo não biopsiado
14	Íleo não biopsiado
15	Ìleíte granulocítica marcante; epitélio comprometido (atenuação e perda focal de epitélio); até 10 granulócitos por campo de 40x; menos de 10 linfócitos transmembrânico em aumento de 40x; 30-35% da lâmina própria do vilo ocupada por linfócitos; ausência de agregado linfóide; 50-75% do epitélio ocupado por células caliciformes; canal linfático ocupando cerca de 20-25% da largura da lâmina própria do vilo.
16	NR
17	NR
18	Amostra inadequada para realização de avaliação histopatológica.
19	Epitélio não avaliado; entre 10 e 20 linfócitos transmembrânico em campo de 40x; moderada a severa quantidade de granulócitos e moderada quantidade de linfócito ocupando lâmina própria do vilo; presença de agregado linfóide expansivo com evidência de hiperplasia linfóide; até 50% do epitélio ocupado por células caliciformes; canal linfático ocupando cerca de 50% da largura da lâmina própria do vilo, caracterizando moderada linfangectasia.
20	NR

NR – exame colonoscópico não realizado

5.5 Processamento laboratorial

5.5.1 Fator de necrose tumoral (TNF-α)

Apenas um animal do grupo controle apresentou valores de TNF-alfa quantificável (14,83 pg/ml). Todos os demais animais do grupo controle assim como todos os cães do grupo afetado não apresentaram TBF-alfa quantificável.

5.5.2 Proteína C-reativa

O grupo afetado apresentou mediana de 1,85 mg/L com valores mínimo e máximo de 0,10 e 44,00 mg/L, respectivamente; enquanto que no grupo controle, a mediana foi 0,10 mg/L e os valores variaram entre 0,10 e 6,30 mg/L respectivamente (Tabela 4 e Gráfico 7). Foi considerada estatisticamente significante a diferença entre as medianas dos grupos comparados (teste de Mann-Whitney, p=0,028). Entretanto, levando-se em conta o valor de referência proposto (entre 0 e 7,6 mg/L), apenas cinco animais afetados obtiveram valores de proteína C reativa superiores aos níveis considerados normais. No grupo controle, nenhum animal apresentou elevação destes valores.

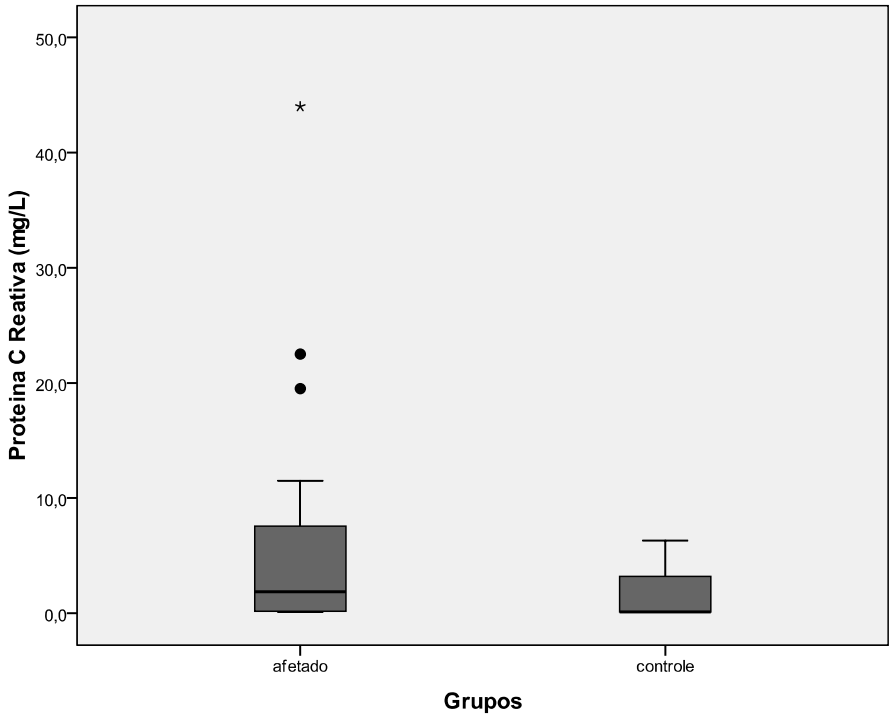
Os dados referentes às mensurações de proteína C reativa para cada animal encontram-se no apêndice B

Tabela 4 – Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores de proteína C-reativa – FMVZ/USP – São Paulo – 2012

Grupo	n	Mediana	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	IC 95%	
Afetado	20	1,85a	6,65	10,88	0,10	44,00	1,56	11,74
Controle	20	0,10	1,42	2,11	0,10	6,30	0,42	2,41

n:número de amostras, IC: intervalo de confiança
a: estatisticamente significativo (p=0,028)

Gráfico 7 – Representação gráfica dos valores de proteína C reativa nos grupos afetado e controle - FMVZ/USP – São Paulo – 2012



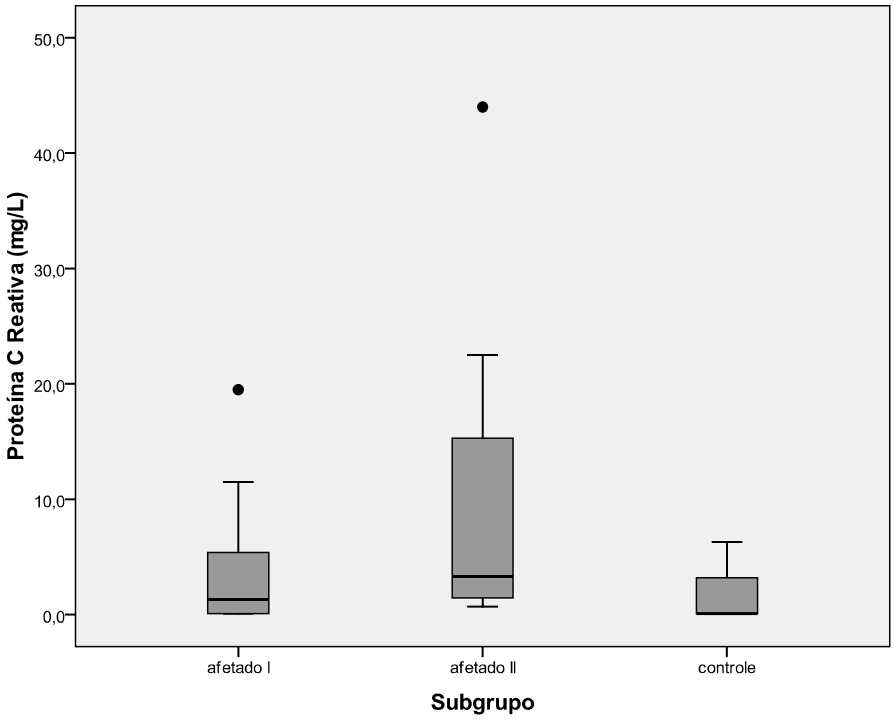
Quando se analisam os dados referentes aos subgrupos, tem-se valores de mediana de : 1,30 mg/L para grupo afetado I , 3,30 mg/L para grupo afetado II e 0,10 mg/L para o grupo controle (tabela 5 e gráfico 8). A comparação entre os três subgrupos foi considerado estatisticamente significativa (p= 0,021; teste de Kruskal-Wallis). Quando pareados, a comparação entre afetado severo e controle foi considerada estatisticamente significativa (p<0,05).

Tabela 5 – Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores de proteína C-reativa por subgrupo – FMVZ/USP – São Paulo – 2012

Subgrupo	n	Mediana	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	IC 95%	
Afetado I	13	1,30[a]	3,96	5,83	0,10	19,50	0,44	7,49
Afetado II	7	3,30[b]	11,64	16,19	0,70	44,00	-3,33	26,62
Controle	20	0,10	1,42	2,11	0,10	6,30	0,42	2,41

n:número de amostras, IC: intervalo de confiança
a: estatisticamente significativo para afetado leve, afetado severo e controle (p=0,021);
b: estatisticamente significativo para afetado severo e controle (p<0,05)

Gráfico 8 – Representação gráfica dos valores de proteína C reativa nos sub-grupos - FMVZ/USP – São Paulo – 2012



5.5.3 Calprotectina

5.5.3.1 Calprotectina sérica

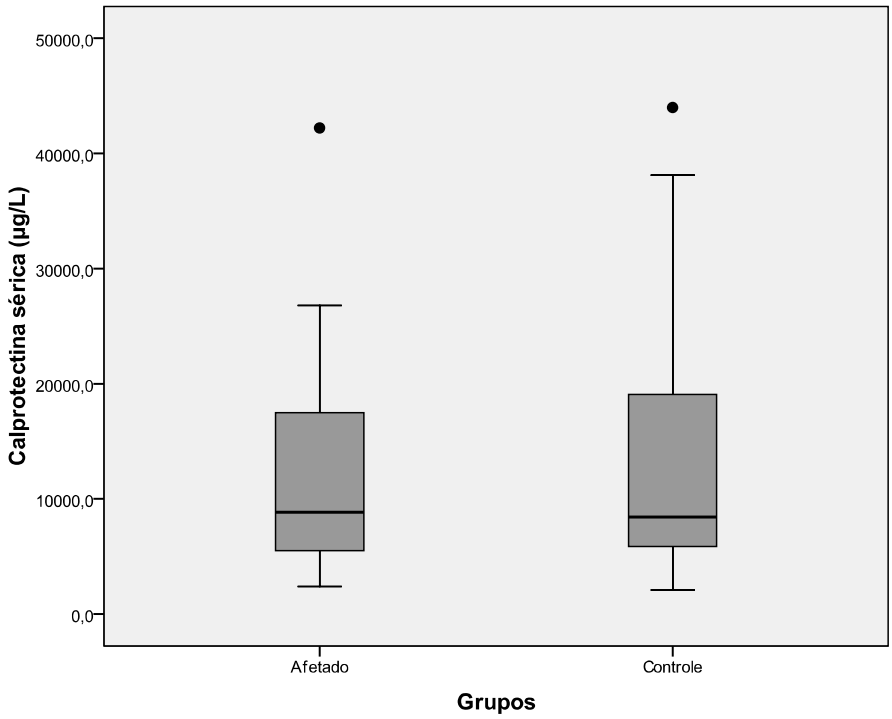
A mediana do grupo afetado foi 8829,00 µg/L enquanto que animais do grupo controle obtiveram mediana de 8420,80 µg/L. A diferença entre as medianas dos dois grupos não foi considerada estatisticamente significante (p=0,779, teste de Mann-Whitney) mesmo com valores do grupo afetado discretamente maiores ao grupo controle (Tabela 6 e Gráfico 9).

Tabela 6 – Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores séricos da calprotectina – FMVZ/USP - São Paulo – 2012

Grupo	N	Mediana	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	IC 95%	
Afetado	20	8829,00	12044,47	9774,92	2384,60	42220,00	7469,66	16619,27
Controle	20	8420,80	14468,63	11930,03	2068,80	43986,00	8885,20	20052,05

n:número de amostras; IC: intervalo de confiança

Gráfico 9 – Representação gráfica dos valores de calprotectina sérica nos grupos afetado e controle - FMVZ/USP – São Paulo – 2012



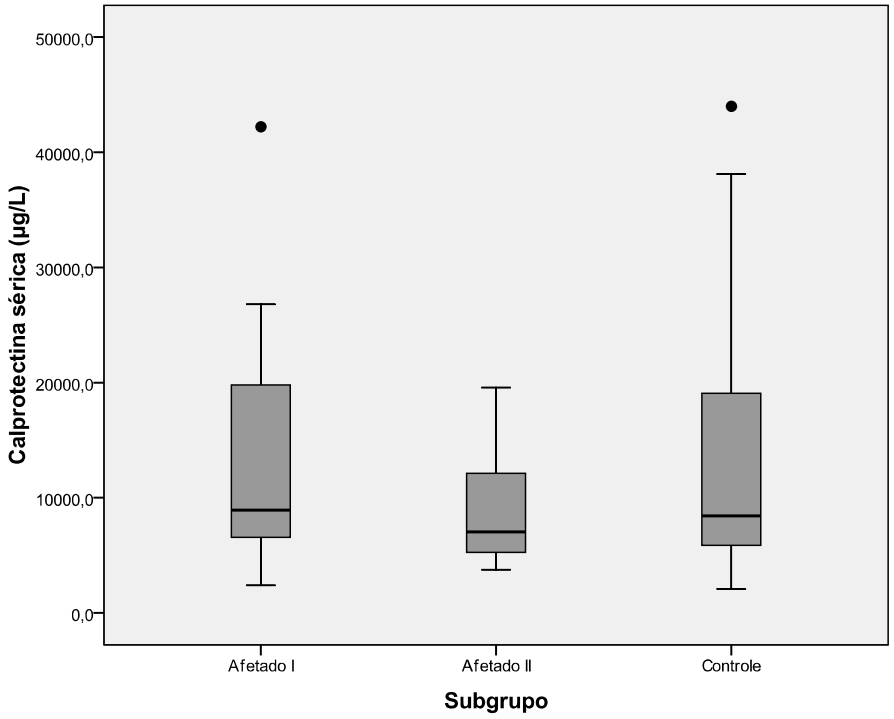
Quando se analisam os dados referentes aos subgrupos, tem-se valores de mediana de: 8908,00 µg/L (grupo afetado I), 7022,80 µg/L (grupo afetado II) e 8420,80 µg/L (grupo controle). A comparação entre os três grupos não foi considerado estatisticamente significativa (p= 0,645; teste de Kruskal-Wallis; Tabela 7 e Gráfico 10).

Tabela 7 – Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores séricos da calprotectina por subgrupo – FMVZ/USP - São Paulo – 2012

Subgrupo	n	Mediana	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	IC 95%	
Afetado I	13	8908,00	13522,60	11262,69	2384,60	42220,00	6716,62	20328,57
Afetado II	7	7022,80	9299,37	5945,62	3753,40	19582,00	3800,58	14798,16
Controle	20	8420,80	14468,63	11930,03	2068,80	43986,00	8885,203	20052,05

n:número de amostras, IC: intervalo de confiança

Gráfico 10 – Representação gráfica dos valores de calprotectina sérica nos subgrupos - FMVZ/USP – São Paulo – 2012



5.5.3.2 Calprotectina fecal

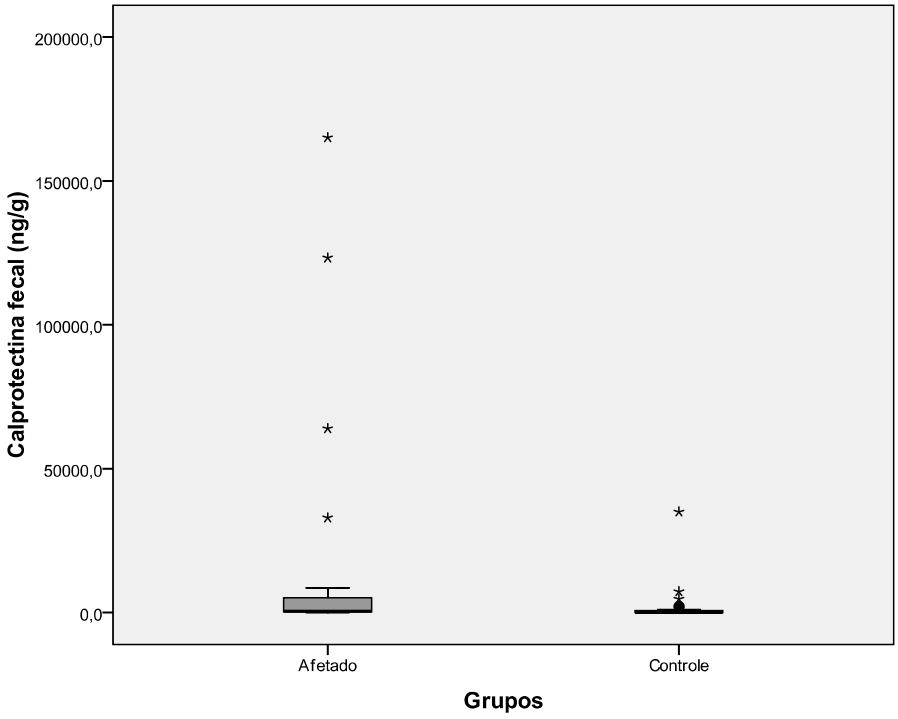
A mediana do grupo afetado foi 411,40 ng/g enquanto que os animais do grupo controle apresentaram mediana de 39,60 ng/g. A diferença entre as medianas dos dois grupos foi considerada estatisticamente significativa (p=0,026, teste de Mann-Whitney; Tabela 8 e Gráfico 11).

Tabela 8 – Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores fecais da calprotectina – FMVZ/USP - São Paulo – 2012

Grupo	N	Mediana	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	IC 95%	
Afetado	20	411,40	20041,69	45680,02	39,60	165056,30	-1337,21	41420,60
Controle	20	39,60	2555,00	7854,95	39,60	34970,30	-1121,22	6231,23

n:número de amostras; IC: intervalo de confiança
a: estatisticamente significativo (p=0,026)

Gráfico 11 – Representação gráfica dos valores de calprotectina fecal nos grupos afetado e controle - FMVZ/USP – São Paulo – 2012



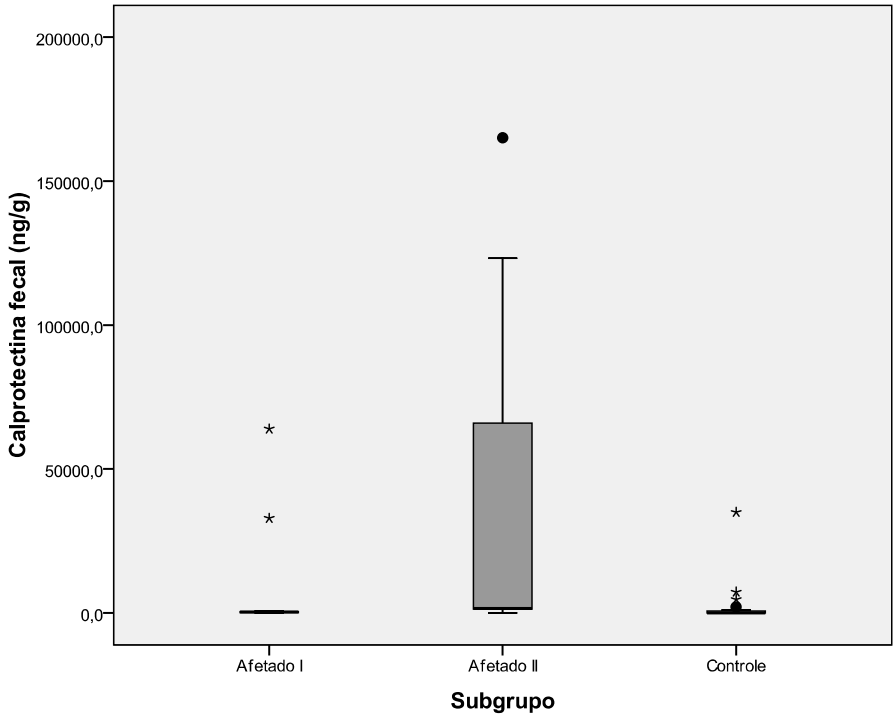
A avaliação dos subgrupos foi considerada estatisticamente significante (p=0,019, teste de Mann-Whitney). A mediana do grupo afetado I foi 299,60 ng/g enquanto que os animais do grupo afetado II apresentaram mediana de 1548,00 ng/g. Os animais do grupo controle mostraram mediana de 39,60 ng/g (Tabela 9 e Gráfico 12). Quando cotejados, a comparação entre grupo afetado severo e grupo controle foi considerada estatisticamente significativa (p<0,05).

Tabela 9 – Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores fecais da calprotectina por subgrupo – FMVZ/USP - São Paulo – 2012

Subgrupo	n	Mediana	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	IC 95%	
Afetado I	13	299,60[a]	7675,96	19155,69	39,60	63922,50	-3899,70	19251,62
Afetado II	7	1548,00[b]	43006,62	70194,69	39,60	165056,30	-21912,63	107925,89
Controle	20	39,60	2555,00	7854,95	39,60	34970,30	-1121,22	6231,23

n:número de amostras, IC: intervalo de confiança
a: estatisticamente significativo para afetado leve, afetado severo e controle (p=0,019);
b: estatisticamente significativo para afetado severo e controle (p<0,05)

Gráfico 12 – Representação gráfica dos valores de calprotectina fecal nos subgrupos - FMVZ/USP – São Paulo – 2012



5.5.4 Proteína S100A12

5.5.4.1 Proteína S100A12 sérica

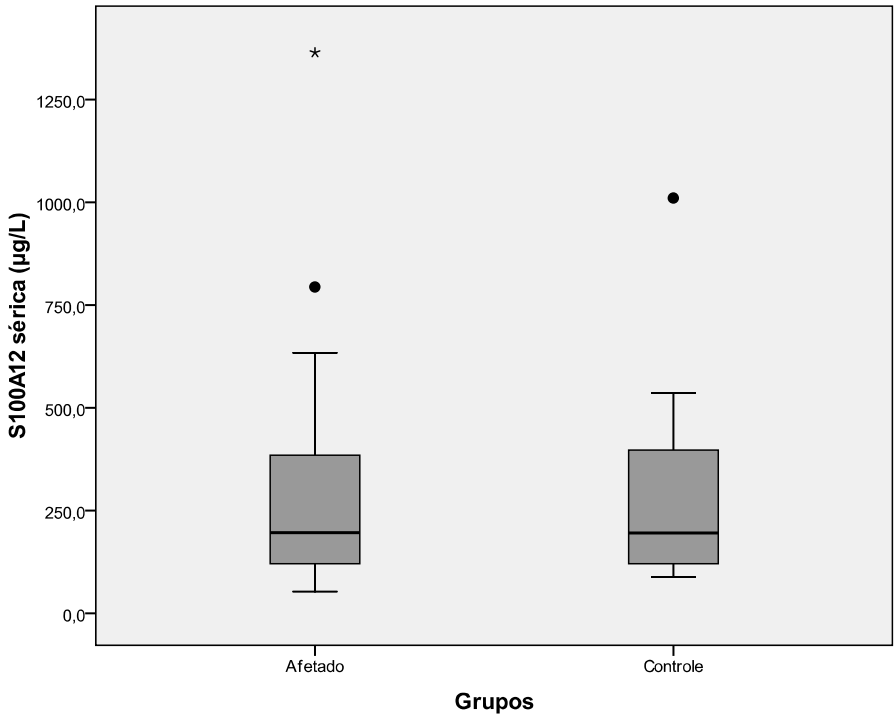
A mediana do grupo afetado foi 195,90 µg/L enquanto que os animais do grupo controle obtiveram mediana de 195,55µg/L. A diferença entre as medianas dos dois grupos não foi considerada estatisticamente significante (p=0,947, teste de Mann-Whitney; Tabela 10 e Gráfico 13). As mensurações individuais encontram-se no apêndice C.

Tabela 10 – Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores séricos da proteína S100A12 – FMVZ/USP - São Paulo – 2012

Grupo	N	Mediana	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	IC 95%	
Afetado	20	195,90	318,69	313,84	52,60	1364,30	171,80	465,57
Controle	20	195,55	281,01	223,79	87,60	1010,30	176,27	385,74

n:número de amostras; IC: intervalo de confiança

Gráfico 13 – Representação gráfica dos valores de proteína S100A12 nos grupos afetado e controle - FMVZ/USP – São Paulo – 2012



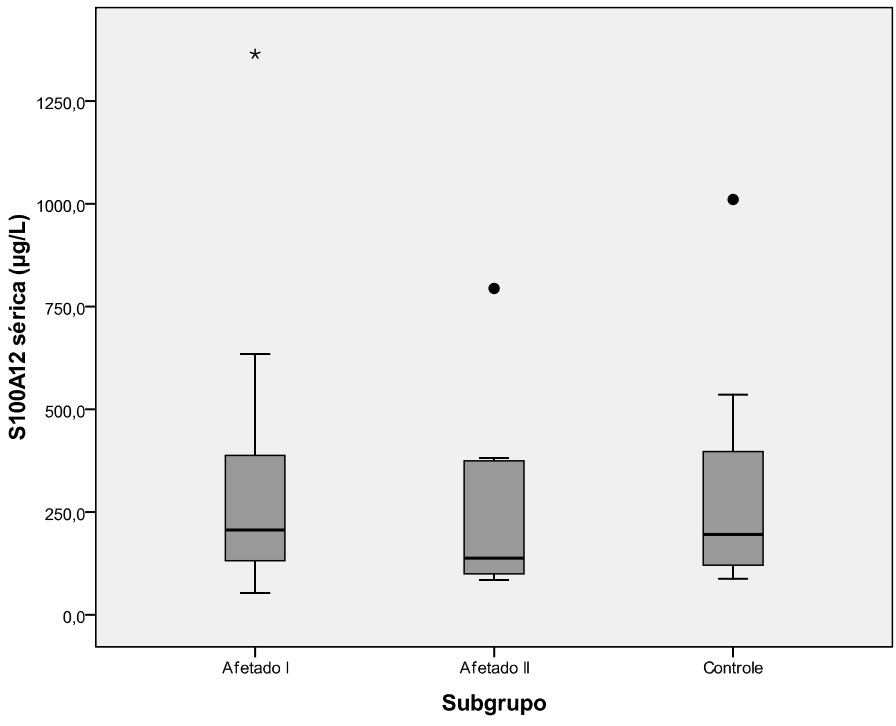
Quando se analisam os dados referente aos subgrupos, tem-se valores de mediana de: 206,60 µg/L (afetado I), 137,60 µg/L (afetado II) e 195,55 µg/L (controle). A comparação entre os três grupos não foi considerado estatisticamente significativa (p= 0,7353; teste de Kruskal-Wallis; Tabela 11 e Gráfico 14).

Tabela 11 – Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores séricos da proteína S100A12 por subgrupo – FMVZ/USP - São Paulo – 2012

Subgrupo	n	Mediana	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	IC 95%	
Afetado I	13	206,60	339,19	347,57	52,60	1364,30	129,15	549,23
Afetado II	7	137,60	280,60	260,15	84,50	794,00	39,99	521,20
Controle	20	195,55	281,00	223,78	87,60	1010,30	176,26	385,74

n:número de amostras, IC: intervalo de confiança

Gráfico 14 – Representação gráfica dos valores de proteína S100A12 nos subgrupos - FMVZ/USP – São Paulo – 2012



5.5.4.2 Proteína S100A12 fecal

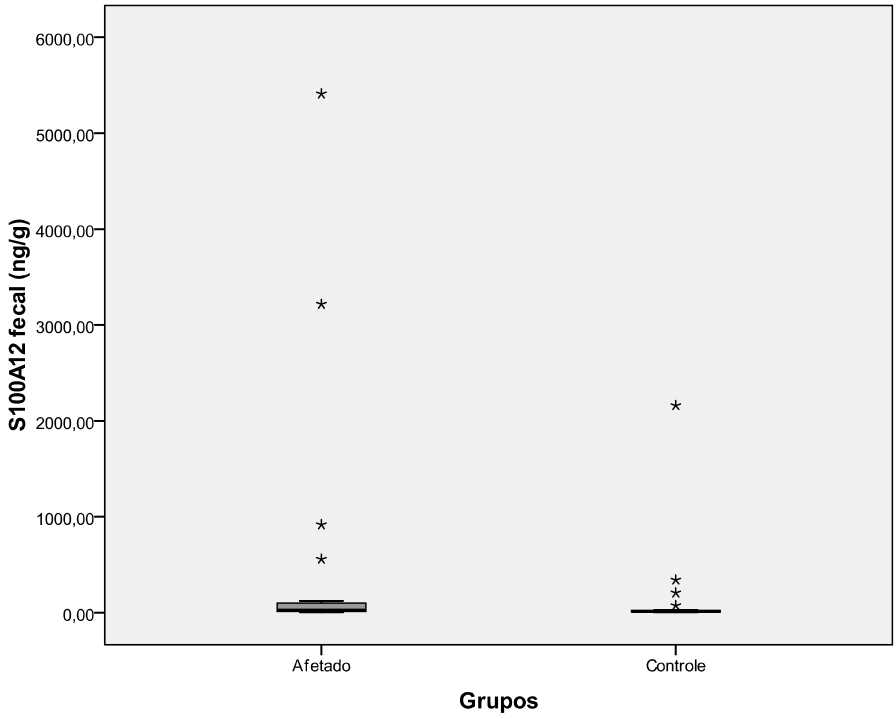
A mediana da média das duas amostras de fezes selecionadas do grupo afetado foi 25,07 ng/g, enquanto que os animais do grupo controle apresentaram mediana de 12,27 ng/g (Tabela 12 e Gráfico 15). Embora a diferença entre as medianas dos dois grupos não foi considerada estatisticamente significativa (p=0,091, teste de Mann-Whitney), observam-se valores superiores nos animais afetados quando comparado aos animais controles. Os dados referentes às mensurações individuais para cada animal encontram-se no apêndice D.

Tabela 12 – Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores fecais da proteína S100A12 – FMVZ/USP – São Paulo – 2012

Grupo	N	Mediana	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	IC 95%	
Afetado	20	25,07	528,29	1361,67	2,45	5411,00	-108,99	1165,57
Controle	20	12,27	147,86	480,97	2,85	2160,00	-77,24	372,96

n: número de amostras; IC: intervalo de confiança

Gráfico 15 – Representação gráfica dos valores fecais de proteína S100A12 nos grupos afetado e controle - FMVZ/USP – São Paulo – 2012



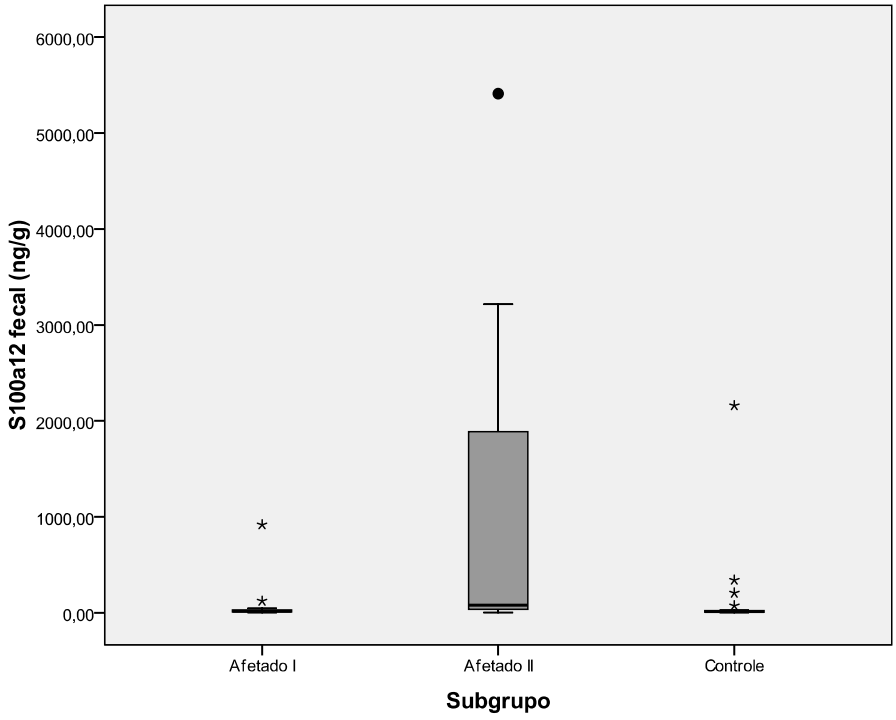
Quando da análise os dados referentes aos subgrupos para os valores fecais de S100A12, tem-se valores de mediana de: 17,15 ng/g (afetado I); 80,30 ng/g (afetado II) e 12,27 ng/g (controle) (Tabela 13 e Gráfico 16). Da mesma forma como descrito na análise entre afetados e controle, embora a comparação entre os três subgrupos não tenha sido considerada estatisticamente significativa (p= 0,054; teste de Kruskal-Wallis), observam-se valores superiores nos animais afetados quando comparados aos controles e uma notável diferença entre animais do grupo afetado I e afetado II.

Tabela 13 – Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores fecais da proteína S100A12 por subgrupo – FMVZ/USP – São Paulo – 2012

Subgrupo	N	Mediana	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	IC 95%	
Afetado I	13	17,15	94,20	249,42	2,45	917,85	-56,52	244,92
Afetado II	7	80,30	1334,45	2140,22	3,10	5411,00	-644,92	3313,83
Controle	20	12,27	147,86	480,97	2,85	2160,00	-77,24	372,96

n: número de amostras; IC: intervalo de confiança

Gráfico 16 – Representação gráfica dos valores fecais de proteína S100A12 nos subgrupos - FMVZ/USP – São Paulo – 2012



5.5.5 Folato e Cobalamina

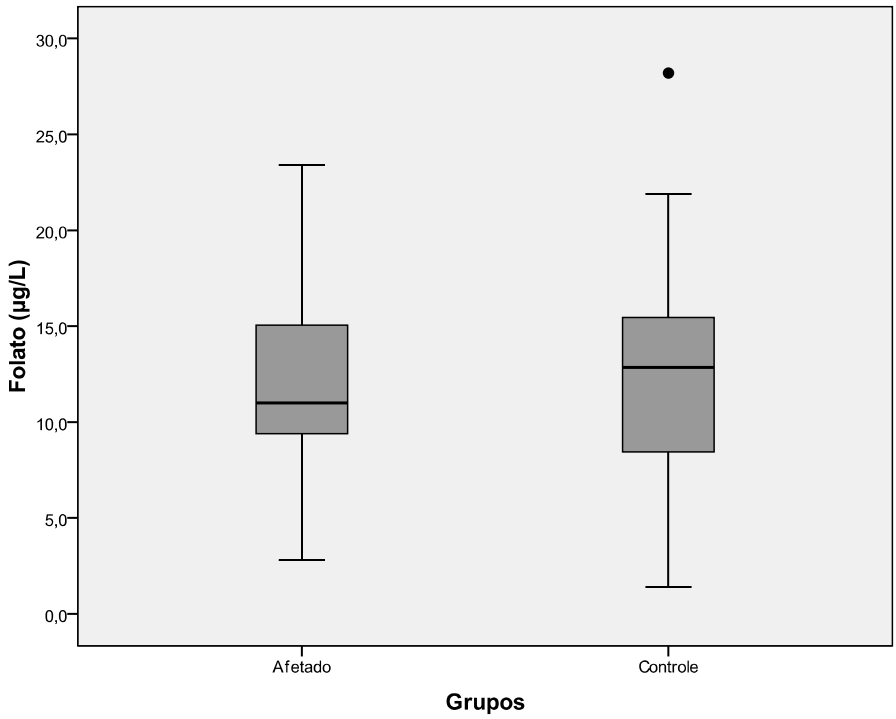
No que se refere à determinação de folato, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos afetado e controle (p=0,989; teste de Mann-Whitney) e apresentaram medianas de 11,00 µg/L e 12,85 µg/L respectivamente (Tabela 14 e Gráfico 17).

Tabela 14 – Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores de folato – FMVZ/USP – São Paulo – 2012

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	IC 95%	
Afetado	19	12,06	5,01	11,00	2,80	23,40	9,65	14,48
Controle	20	12,33	6,31	12,85	1,40	28,20	9,37	15,29

n: número de amostras; IC: intervalo de confiança

Gráfico 17 – Representação gráfica dos valores de folato nos grupos afetado e controle - FMVZ/USP – São Paulo – 2012



Quanto à determinação de cobalamina, também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos grupos afetado e controle (Afetado – 490,50 ng/L *versus* Controle – 525,50 ng/L; teste de Mann-Whitney, p=0,640) (Tabela 15 e Gráfico 18).

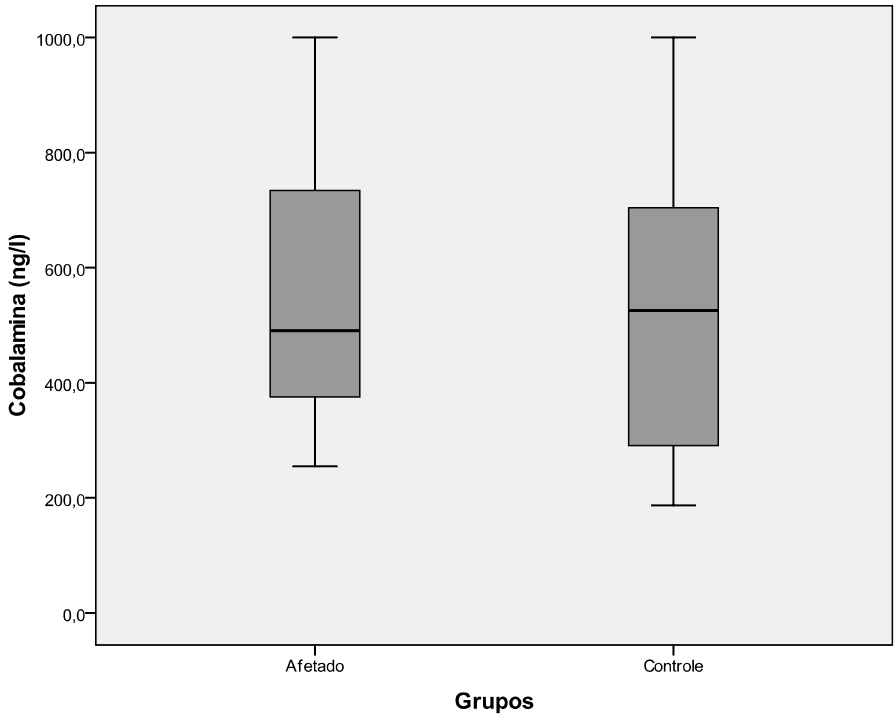
O quadro referente às mensurações de folato e cobalamina para cada animal encontram-se no apêndice E.

Tabela 15 – Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores de cobalamina – FMVZ/USP – São Paulo – 2012

Grupo	N	Mediana	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	IC 95%	
Afetado	20	490,50	553,65	220,12	255,00	1000,00	450,62	656,67
Controle	20	535,50	525,70	259,07	187,00	1000,00	404,44	646,95

n: número de amostras; IC: intervalo de confiança

Gráfico 18 – Representação gráfica dos valores de cobalamina nos grupos afetado e controle - FMVZ/USP – São Paulo – 2012



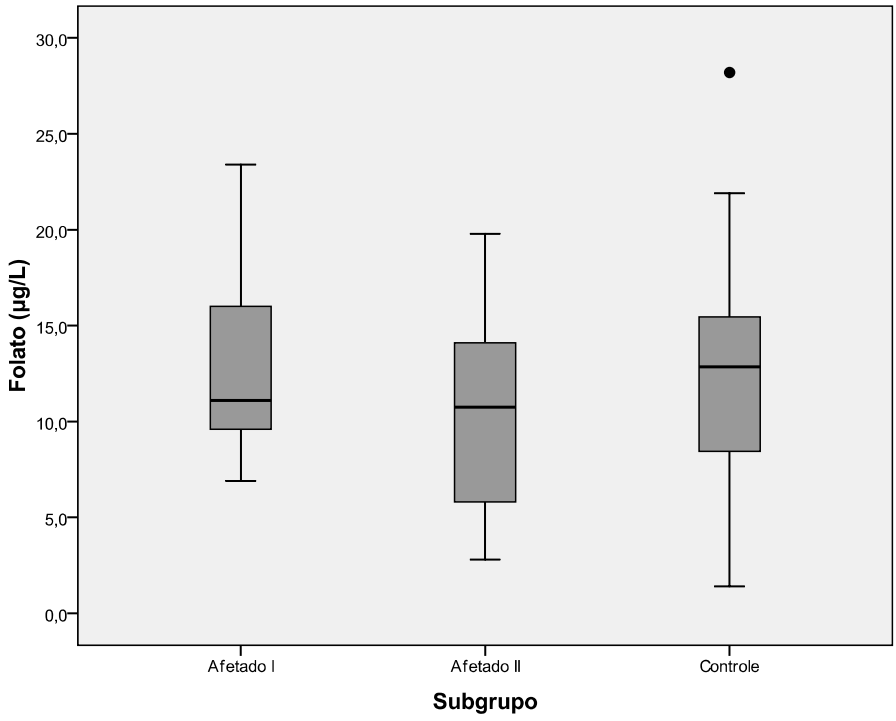
Quando se analisam os dados de folato referentes aos subgrupos, tem-se valores de mediana de: 11,10 µg/L para grupo afetado I, 10,75 µg/L para grupo afetado II e 12,85 µg/L para grupo controle (Tabela 16 e Gráfico 19). A comparação entre os três grupos não foi considerado estatisticamente significativa (p= 0,783; teste de Kruskal-Wallis).

Tabela 16 – Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores de folato por subgrupo – FMVZ/USP - São Paulo – 2012

Subgrupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	IC 95%	
Afetado I	13	12,71	4,60	11,10	6,90	23,40	9,93	15,49
Afetado II	6	10,66	6,01	10,75	2,80	19,80	4,35	16,97
Controle	20	12,33	6,31	12,85	1,40	28,20	9,37	15,29

n: número de amostras; IC: intervalo de confiança

Gráfico 19 – Representação gráfica dos valores de folato nos subgrupos - FMVZ/USP – São Paulo – 2012



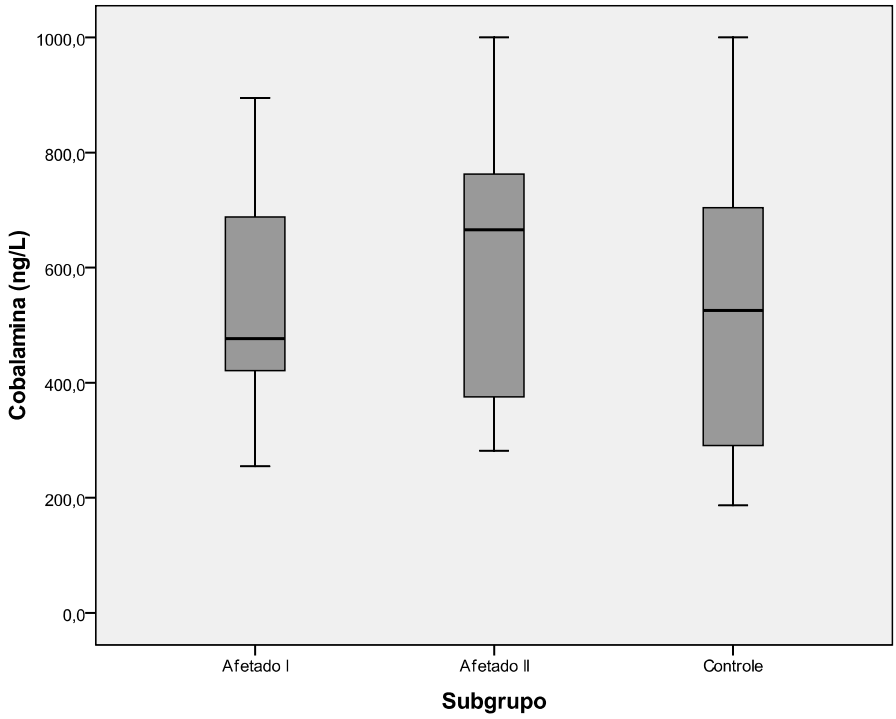
A comparação dos dados de cobalamina referentes aos subgrupos também não foi considerada estatisticamente significativo (p= 0,764; teste de Kruskal-Wallis). As medianas foram: 477,00 ng/L para afetado I, 666,00 ng/L para afetado II e 525,50 ng/L para controle (Tabela 17 e Gráfico 20).

Tabela 17 – Mediana, média, desvio-padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo dos valores de cobalamina por subgrupo – FMVZ/USP - São Paulo – 2012

Subgrupo	n	Mediana	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	IC 95%	
Afetado I	13	477,00	526,84	198,69	255,00	895,00	406,77	646,91
Afetado II	7	666,00	603,42	264,63	282,00	1000,00	358,67	848,17
Controle	20	525,50	525,70	259,07	187,00	1000,00	404,44	646,95

n:número de amostras; IC: intervalo de confiança

Gráfico 20 – Representação gráfica dos valores de cobalamina nos subgrupos - FMVZ/USP – São Paulo – 2012



5.6 Correlação entre as variáveis analisadas

Foi considerada significante a correlação direta moderada e positiva entre proteína C reativa e escore clínico (r=0,518, p=0,019; coeficiente de correlação de Spearman). De forma semelhante, a proteína C reativa foi correlacionada ao escore histopatológico do cólon (r=0,633, p=0,037; coeficiente de correlação de Spearman) e ao escore histopatológico máximo (r=0,491, p=0,028; coeficiente de correlação de Spearman). Não foi considerada estatisticamente significante a correlação entre proteína C-reativa e albumina sérica nos animais afetados (r=-0,090, p=0,7475; coeficiente de correlação de Spearman).

Não se obteve correlação significante entre valores séricos de S100A12 e escore clínico (r=0,213, p=0,3674; coeficiente de correlação de Spearman) assim como a análise entre valores fecais de S100A12 e escore clínico (r=0,313, p=0,1781; coeficiente de correlação de Spearman).

Por sua vez, a albumina mostrou correlação moderada e negativa tanto com valores de calprotectina fecal (r=-0,457, p=0,049) e proteína S100A12 fecal (r=-0,523, p=0,021; coeficiente de correlação de Spearman).

Observou-se correlação do tipo direta e forte entre os valores séricos de S100A12 e calprotectina (r=0,810, p=0,000; coeficiente de correlação de Spearman), bem como entre os valores fecais das mesmas proteínas (r=0,941, p=0,000; coeficiente de correlação de Spearman). Entretanto, não foi detectada correlação significante entre valores séricos e fecais de S100A12 (r=0,202, p=0,211; coeficiente de correlação de Spearman) assim como entre valores séricos e fecais de calprotectina (r=0,223, p=0,166; coeficiente de correlação de Spearman).

As variáveis folato e cobalamina não apresentaram grau de correlação no grupo dos animais acometidos por DIIC (coeficiente de correlação de Spearman= 0,019 e p=0,9384). Quando se analisou os dados tanto dos animais afetados quanto dos controles, também não foi observada correlação entre estas variáveis (coeficiente de correlação de Spearman= 0,202 e p=0,2293).

A correlação entre valores de folato e escore clínico nos animais afetados não foi estatisticamente significante (r=-0,183 e p=0,4518; coeficiente de correlação de Spearman). De forma semelhante, também não notou-se correlação entre valores de

cobalamina e escore clínico nos animais afetados (r=0,088, p=0,7190; coeficiente de correlação de Spearman).

Quanto aos escores endoscópicos e histopatológicos, não se observou correlação entre estas variáveis dentro de cada região analisada (Tabela 18). Da mesma forma, não houve correlação significativa entre os valores máximos de escore endoscópico e escore histopatológico (r=0,156 e p=0,512; coeficiente de correlação de Spearman). Estes resultados estão de acordo com a avaliação individual dos animais visto que alguns cães apresentam concordância entre os achados endoscópicos e histopatológicos enquanto outros apresentam discordâncias, mesmo sem levar em conta os escores propostos. Algumas destas avaliações foram representadas pelas figuras 24 a 29.

Os valores de todas as correlações realizadas encontram-se na tabela 19.

Quadro 12 – Descrição dos escores endoscópicos e histopatológicos dos animais do grupo afetado – FMVZ/USP - São Paulo – 2012

CÃO	ESCORE ENDOSCÓPICO ESTOMAGO	ESCORE HISTOLÓGIVO ESTOMAGO	ESCORE ENDOSCÓPICO DUODENO	ESCORE HISTOLÓGICO DUODENO	ESCORE ENDOSCÓPICO CÓLON	ESCORE HISTOLÓGICO CÓLON
1	NR	NR	NR	NR	1	10
2	3	0	1	3	NR	NR
3	1	4	1	8	NR	NR
4	0	2	2	5	NR	NR
5	1	2	0	5	1	3
6	NR	NR	NR	NR	3	8
7	1	3	1	4	NR	NR
8	1	3	1	5	1	10
9	1	1	1	5	1	7
10	1	1	1	0	NR	NR
11	1	3	0	NR	NR	NR
12	2	4	2	9	2	5
13	1	6	NR	3	0	6
14	1	2	1	4	1	3
15	1	4	1	6	3	5
16	3	9	1	6	NR	NR
17	1	2	1	5	NR	NR
18	1	3	1	NR	2	8
19	2	5	2	6	3	3
20	1	2	1	3	NR	NR

Quadro 13 – Correlações entre as variáveis analisadas – FMVZ/USP - São Paulo - 2012

	ESCORE CLINICO	ALBUMINA	PROTEINA C REATIVA	S100A12 SERICA	S100A12 FECAL	CAL PROTECTINA SERICA	CAL PROTECTINA FECAL	FOLATO	COBALAMINA	ESCORE HISTOPATO ESTOMAGO	ESCORE HISTOPATO DUODENO	ESCORE HISTOPATO COLON	ESCORE HISTOPATO MÁXIMO	ESCORE ENDOSCOPICO ESTOMAGO	ESCORE ENDOSCOPICO DUODUNO	ESCORE ENDOSCOPICO COLON	ESCORE ENDOSCOPICO MÁXIMO
ESCORE CLINICO	1																
ALBUMINA	p=0,064 r=-0,434	1															
PROTEINA C REATIVA	p=0,019 r=0,518	p=0,264 r=-0,270	1														
S100A12 SERICA	p=0,367 r=-0,213	p=0,491 r=0,168	p=0,716 r=0,059	1													
S100A12 FECAL	p=0,052 r=0,441	p=0,021 r=-0,523	p=0,171 r=0,221	p=0,211 r=-0,202	1												
CAL PROTECTINA SERICA	p=0,345 r=-0,223	p=0,516 r=-0,159	p=0,245 r=-0,188	p=0,000 r=0,810	p=0,313 r=-0,164	1											
CAL PROTECTINA FECAL	p=0,102 r=0,377	p=0,049 r=-0,457	p=0,143 r=0,236	p=0,136 r=-0,240	p=0,000 r=0,941	p=0,166 r=-0,223	1										
FOLATO	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	1									
COBALAMINA	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	p=0,222 R=0,200	1								
ESCORE HISTOPATO ESTOMAGO	p=0,756 r=0,079	Ø	p=0,560 r=0,147	p=0,586 r=0,138	p=0,505 r=-0,168	p=0,276 r=0,271	p=422 r=-0,202	Ø	Ø	1							
ESCORE HISTOPATO DUODENO	p=0,547 r=0,163	p=0,243 r=-0,321	p=0,372 r=0,240	p=0,969 r=0,011	p=0,774 r=-0,078	p=0,354 r=0,248	p=0,952 r=0,017	p=0,065 r=0,487	p=0,645 r=0,125	p=0,021 r=0,569	1						
ESCORE HISTOPATO COLON	p=0,666 r=-0,147	p=0,820 r=-0,083	p=0,037 r=0,633	p=0,946 r=-0,023	p=0,756 r=-0,106	p=0,111 r=-0,507	p=0,847 r=-0,066	Ø	Ø	p=0,895 r=-0,052	p=0,407 r=-0,342	1					
ESCORE HISTOPATO MÁXIMO	p=0,779 r=-0,067	p=0,630 r=-0,118	p=0,028 r=0,491	p=0,489 r=-0,164	p=0,585 r=-0,130	p=0,301 r=-0,243	p=0,795 r=-0,062	Ø	Ø	p=0,020 r=0,542	p=0,032 r=0,538	p=0,000 r=0,911	1				
ESCORE ENDOSCOPICO ESTOMAGO	p=0,356 r=0,231	p=0,382 r=-0,227	p=0,784 r=0,069	p=0,702 r=-0,097	p=0,687 r=0,102	p=0,486 r=0,175	p=0,926 r=-0,024	Ø	Ø	p=0,251 r=0,285	Ø	Ø	Ø	1			
ESCORE ENDOSCOPICO DUODUNO	p=0,745 r=0,085	p=0,165 r=-0,365	p=0,979 r=-0,007	p=0,566 r=-0,150	p=0,329 r=0,252	p=0,578 r=0,145	p=0,373 r=0,231	Ø	Ø	Ø	p=0,183 r=0,364	Ø	Ø	p=0,526 r=0,165	1		
ESCORE ENDOSCOPICO COLON	p=0,323 r=0,329	p=0,157 r=-0,483	p=o,166 r=0,449	p=0,978 r=0,010	p=0,475 r=0,241	p=0,629 r=0,165	p=0,248 r=0,381	Ø	Ø	Ø	Ø	p=0,667 r=-0,156	Ø	p=0,129 r=0,546	p=0,121 r=0,594	1	
ESCORE ENDOSCOPICO MÁXIMO	p=0,247 r=0,271	p=0,030 r=-0,498	p=0,372 r=0,211	p=0,977 r=0,007	p=0,254 r=0,267	p=0,488 r=0,165	p=0,272 r=0,258	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	p=0,512 r=0,156	p=0,033 r=0,503	p=0,028 r=0,533	p=0,000 r=0,961	1

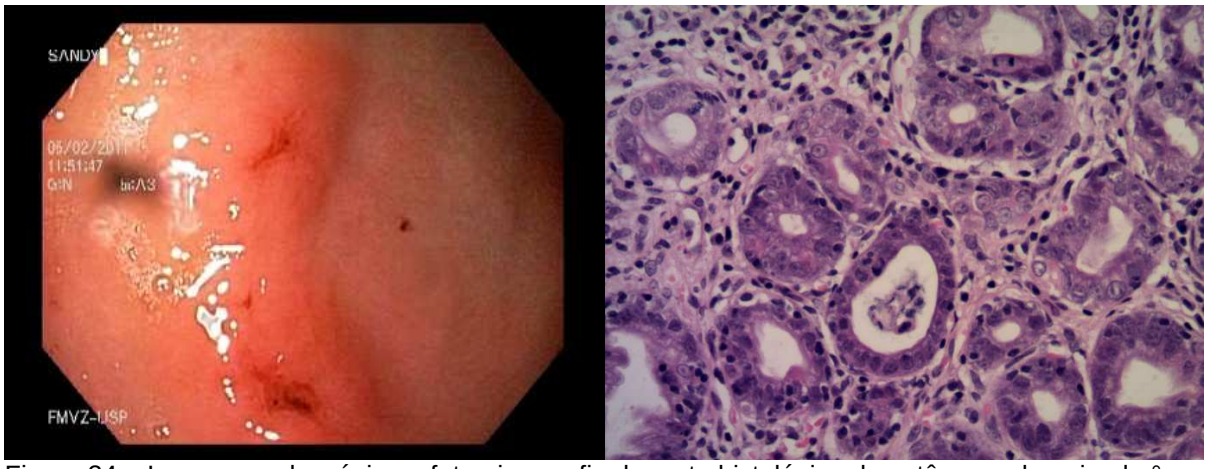


Figura 24 – Imagem endoscópica e fotomicrografia de corte histológico de estômago do animal n° 16. Concordância entre achado endoscópico e histopatológico. Edema e hiperemia moderados de cavidade gástrica com ulceração; moderada injuria de superfície epitelial e fossetas gástricas, moderado infiltrado linfoplasmocítico em lâmina própria e linfócitos intraepiteliais, leve infiltrado neutrofílico em lâmina própria, microabscedação e restos celulares

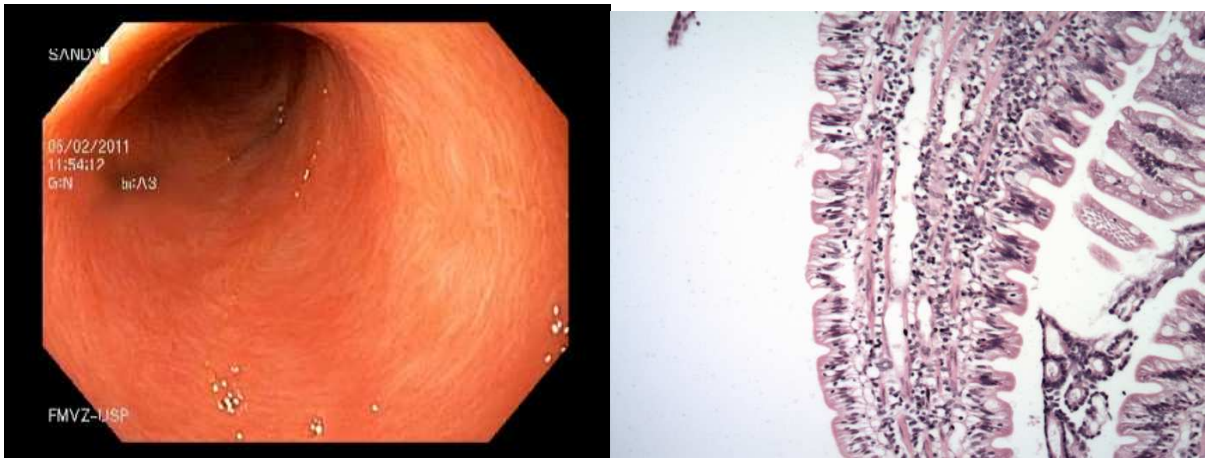


Figura 25 – Imagem endoscópica e fotomicrografia de corte histológico de duodeno do animal n° 16. Discordância entre achado endoscópico e histopatológico. Leve hiperemia duodenal; leve injúria epitelial e distensão de criptas, aumento leve de linfócitos intraepiteliais e marcante infiltrado inflamatório linfoplasmocítico em lâmina própria de duodeno

Figura 26 – Imagem endoscópica e fotomicrografia de corte histológico de duodeno do animal n° 5. Discordância entre achado endoscópico e histopatológico. Duodeno normal pela avaliação endoscópica; leve achatamento de vilosidade, leve dilatação linfática, leve fibrose da mucosa, aumento leve de linfócitos intraepiteliais, leve infiltrado neutrofílico da lâmina própria

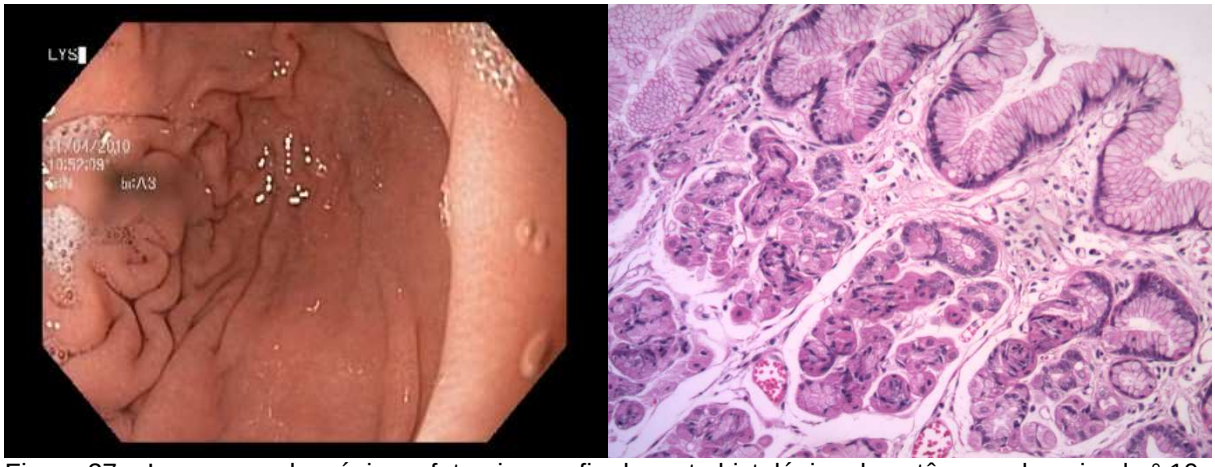


Figura 27 – Imagem endoscópica e fotomicrografia de corte histológico de estômago do animal n° 10. Concordância entre achado endoscópico e histopatológico. Estômago com edema e hiperemia; edema, congestão e leve injúria da superfície epitelial

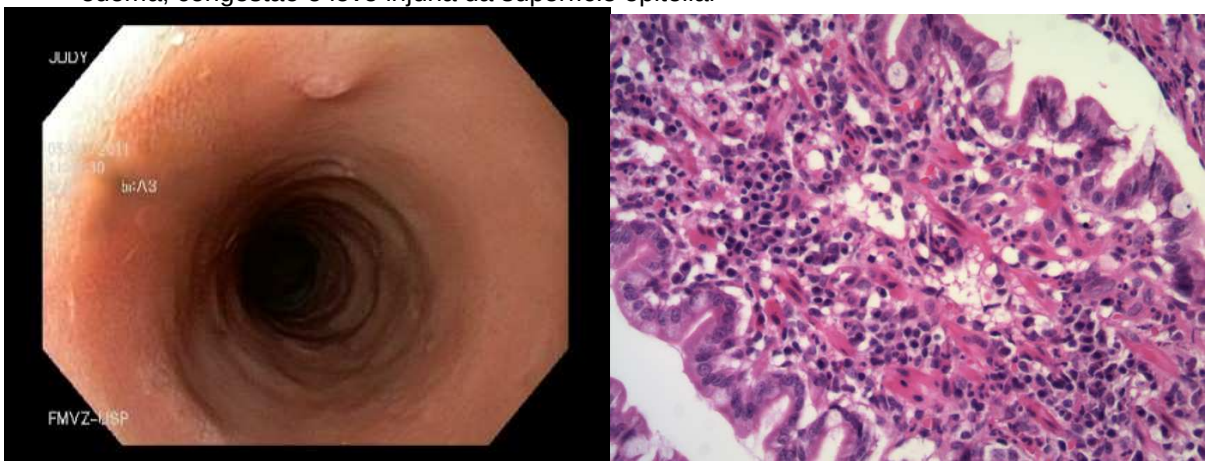


Figura 28 – Imagem endoscópica e fotomicrografia de corte histológico de duodeno do animal n° 15. Discordância entre achado endoscópico e histopatológico. Granulosidade e hiperemia de duodeno; leve achatamento de vilo, leve injúria epitelial, leve distensão de criptas e marcante infiltrado neutrofílico em lâmina própria.

Figura 29 – Imagem endoscópica e fotomicrografia de corte histológico de cólon do animal n° 15. Concordância entre achado endoscópico e histopatológico. Intenso edema, hiperemia, irregularidade e tecido friável em todo trajeto colônico; leve injúria de superfície epitelial, leve hiperplasia de criptas leve dilatação/distorção de criptas, infiltrados linfoplasmocítico e neutrofílico leve.

6 DISCUSSÃO

A complexidade relacionada a DIIC está presente desde a sua definição. Conceitualmente, o termo incorpora os processos inflamatórios idiopáticos que acometem uma ou mais áreas do trato gastrointestinal por períodos considerados crônicos. Entretanto, sabe-se que algumas enteropatias são tratadas de forma separada do grande grupo da DIIC, como a enteropatia crônica dos Sharpeis, enteropatia imunoproliferativa dos Basenjis e a colite ulcerativa dos Boxers uma vez que apresentam particularidades específicas a estas doenças. Alem disso, o diagnóstico definitivo da DIIC só pode ser realizado após a exclusão de diversas afecções que cursam com inflamação gastrointestinal (nem sempre idiopática) e apresentação clínica semelhante como a hipersensibilidade alimentar que, durante anos, foi considerada uma forma de DIIC. Quadros de perdas protéicas, síndromes de má absorção, alterações de microbiota intestinal e linfangectasia podem estar envolvidos nas enteropatias crônicas porém, por vezes, são tratados de forma separada.

Outro fator relacionado à complexidade da afecção nos cães é a inexistência de padrões que estabeleçam o tipo de resposta celular e humoral associadas ao quadro. Em humanos, a identificação de características individuais entre a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa permitiu maior conhecimento e domínio sobre estas enfermidades.

Em nosso estudo, observou-se maior representatividade de animais jovens, com mediana de 2 anos embora a literatura não cite predisposição etária definida. Apenas 5 dos 20 animais estudados apresentaram idade superior a 5 anos. Da mesma forma, mesmo sem a literatura estabelecer maior acometimento sexual, notamos maior quantidade de fêmea em relação a machos (65% *versus* 35%, respectivamente).

O vômito esteve relatado em 85% dos animais incluídos, enquanto que a diarréia foi observada em 55%. Assim como nos estudos prévios, estes foram os sinais mais freqüentes (TAMS, 2005).

Com relação ao exame ultrassonográfico, apenas três animais não apresentaram quaisquer alterações. Entretanto, os achados não foram tão expressivos quanto se poderia esperar. A alteração mais observada foi a repleção

gástrica, em 10 dos 20 animais. Mesmo sendo uma característica correlacionável ao desenvolvimento do quadro, esta repleção pode ser influenciada por diversos fatores e não contribui de forma marcante para o diagnóstico ou estadiamento da doença. Apenas três animais apresentaram espessamento gástrico ao ultra-som, enquanto que na avaliação por endoscopia, todos os animais apresentaram algum grau de edema gástrico e três mostraram espessamento intestinal. Jergens et al (2010) observaram cinco animais com espessamento intestinal e três com linfoadenopatia mesentérica em um universo de 14 cães.

Gaschen et al. (2008) relatam que o espessamento intestinal não é um parâmetro sensível ou específico de detecção de inflamação intestinal e que ecogenicidade de mucosa, linfoadenomegalia além de outros achados secundários relacionados ao trato gastrointestinal podem ser melhor utilizados para fins diagnósticos. Para estes autores, foi possível a observação de dois padrões de elevação de ecogenicidade da mucosa, classificados como manchas ou estriações hiperecóicas (normalmente, espera-se observar uma mucosa hipoecóica). Embora as manchas não tenham sido um padrão específico para o diagnóstico da DIIC, as estriações mostraram 75% de sensibilidade e 96% de especificidade para o diagnóstico de enteropatias de perdas protéicas. Além disto, observou-se correlação entre escore ultrassonográfico e índice clínico da doença no momento inicial do diagnóstico.

Embora a literatura cite correlação entre valores de albumina e gravidade da doença, notamos apenas um cão com valores séricos desta proteína inferior ao valor de referência. Jergens et al. (2010) encontraram hipoalbuminemia em 18 dos 54 animais portadores de DIIC incluídos em seu estudo e Allenspach et al. (2007) relataram 15 de 70 cães com hipoalbuminemia. Segundo estes autores, dos 15 cães, 10 foram diagnosticados com enteropatia de perda protéica, visto que apresentaram panhipoproteinemia associada à severa hipoalbuminemia além de sinais como ascite, edema periférico e efusão torácica. Ainda com relação a este último estudo, embora tenham incidência de hipoalbuminenia superior ao nosso estudo, não foram observadas correlações entre valores séricos de albumina e índice clínico de atividade da doença, escores endoscópicos e histopatológicos. No presente estudo, observou-se correlação do tipo inversa e moderada entre os valores de albumina e valores fecais de calprotectina e proteína S100A12 nos animais afetados. Esta correlação pode ser explicada pelo fato de que na vigência

de processos inflamatórios, espera-se a diminuição de albumina e elevação de calprotectina e S100A12. Mesmo assim, a ocorrência desta correlação foi surpreendente visto que os valores de albumina foram superiores aos esperados e não se observou correlação desta proteína com escore clínico, histológico e PCR. A correlação entre albumina e escore clínico não foi estatisticamente significante mas mostrou uma tendência a ocorrer (p=0,064 e r=0,434). A diminuição de albumina não está apenas relacionada a processos inflamatórios mas também pode ser um indicativo de mal nutrição e/ou mal absorção, condições de teoricamente influenciariam o escore clínico da doença (VERMEIRE et al.; 2006). Em um universo de cães com mediana de escore clínico relativamente baixa, não se esperam valores acentuadamente baixos de albumina.

No que se refere ao estabelecimento de escore clínico, alguns pontos devem ser analisados de forma criteriosa. Semelhante ao que ocorre na medicina, Jergens et al. (2003) buscou criar uma ferramenta de fácil execução para definir o status global da DIIC e monitorar a sua evolução com a instituição do tratamento. No entanto, esta ferramenta assume valores numéricos para variáveis de avaliação subjetiva e que dependem da capacidade de percepção de cada proprietário. Desta forma, sua comparação entre diferentes animais deve ser realizada com extrema cautela visto que os índices são definidos por avaliadores diferentes. Embora seja uma tentativa objetiva de se mensurar a atividade da doença, é dependente das variações individuais dos proprietários, incluindo até uma variação dentro de um mesmo observador, visto que as pessoas podem apresentar características distintas em diferentes momentos dentro de um período de tratamento do animal. Desta forma, a criação deste escore pode contribuir de forma mais fidedigna na avaliação da evolução do tratamento de um mesmo paciente do que na utilização de maneira populacional. Além disto, por se tratar de um escore pontual, um único valor isolado pode não representar de forma adequada a intensidade da doença em determinado animal. Em nosso estudo, padronizou-se o estabelecimento do escore no momento do exame endoscópico, porém o tempo entre o agendamento e a realização propriamente dita do exame variou consideravelmente entre os animais. Desta forma, um cão apresentou escore 0 no momento da realização da endoscopia mesmo sem este número sugerir de forma coerente o grau de doença deste animal. Consideração semelhante foi ponderada por McCann et al (2007) sugerindo que

valores baixos do escore refletem o status clínico do animal apenas no momento de sua realização.

Entretanto, a “aparente subjetividade” deste critério objetivo não inviabiliza sua utilização na veterinária como uma forma de agrupar animais quanto à magnitude da doença, permitindo assim a comparação entre estudos sobre DIIC.

Nesta pesquisa, a mediana dos escores foi cinco com valores variando entre 0 e nove. Associado a esta mediana, 13 dos 20 animais apresentaram valor igual ou inferior a 5 (65%).

Jergens et al. (2010) avaliaram dois tipos de tratamentos para animais com DIIC. Independentemente do tratamento posteriormente instituído, a população total inicial deste estudo foi classificada segundo o índice proposto da seguinte maneira: 20 animais foram considerados com doença leve, 25 animais com doença moderada e 9 animais com doença grave, além de escore médio indicativo de doença moderada. Já no estudo publicado por McCann et al. (2007), a mediana do escore clínico de 16 cães foi 5,5 com valores variando entre 2 e 14.Encontramos, dois animais que foram classificados com doença insignificante (escore inferior a três), sete com doença leve (4-5), quatro com doença moderada (6-8) e três com doença severa (igual ou superior a 9). Desta forma, diferentemente do que a literatura descreve, os nossos valores foram considerados relativamente baixos.

Não foram detectadas correlações entre índice clinico da doença e escore histológico assim como descrito por McCann et al. (2007). Diferentemente do notado por nós e por McCann et al. (2007), Jergens et al. (2004) relataram correlação entre estes dois parâmetros. Entretanto, estes autores utilizaram apenas animais com escore clínico igual ou superior a cinco. Quando analisamos de forma separada apenas os animais classificados como grupo afetado II (escore igual ou superior à seis) observamos correlação semelhante ao descrito por Jergens et al. (2004).

De forma semelhante, não notamos correlação entre o índice clínico e parâmetros como albumina, proteína S100A12, calprotectina e escores endoscópicos. Entretanto, encontramos correlação do tipo positiva e moderada entre este índice e proteína C reativa, incluindo todos os animais do grupo afetado. Jergens et al. (2004) relatam correlação entre estes parâmetros em animais com escore igual ou superior a cinco. Contrariamente, McCann et al. (2007) não observaram esta correlação nos animais estudados, assim como Allenspach et al. (2007).

Embora utilizem parâmetros clássicos, as avaliações endoscópicas e histopatológicas apresentam certa subjetividade em suas realizações, uma vez que dependem da percepção individual do observador. Diversos estudos mostram discordância entre patologistas na análise dos fragmentos de biópsias. A ausência de padrões para estes procedimentos dificulta a uniformidade de avaliação e impossibilita a comparação entre resultados dos diversos estudos. A padronização de critérios histopatológicos pela WSAVA buscou minimizar o erro neste processo, que ainda conta com fatores complicantes como a qualidade das biópsias, tempo de processamento e artefatos técnicos (DAY et al. 2008). Ainda sim, a padronização recomendada baseia-se em análise descritiva sem a definição de valores para o estabelecimento de escores, permitindo a classificação como leve, moderado ou severo dos parâmetros avaliados. A criação de escores busca objetivar esta avaliação descritiva porem conta com o agrupamento de animais nem sempre com o mesmo quadro clinico, uma vez que unem-se, por exemplo, indivíduos com alterações leves em vários parâmetros e indivíduos com alterações mais severas em poucos parâmetros.

No que se refere à avaliação endoscópica, esta se mostra muito mais subjetiva e sem padrão. Mesmo apresentando semelhanças, não existe uma uniformidade entre os diversos estudos que buscam utilizar a endoscopia como forma de diagnóstico, tendo-se, consequentemente, diversos escores diferentes. Jergens et al. (2010) descrevem a escassez de dados referentes à prevalência de anormalidade da mucosa observadas durante a endoscopia em cães com DIIC. Na maioria dos casos, edema, hiperemia, tecido friável e presença de ulcerações definem estas avaliações. Em nosso estudo, utilizamos o descrito por Allenspach et al. (2007) com pequenas adequações, visto que estes autores não incluíam em suas avaliações amostras gástricas.

O edema e a hiperemia foram alterações descritas em todos os animais avaliados, variando quanto à intensidade. Apenas quatro animais apresentaram descontinuidade do epitélio (erosões/ulcerações), o que está em concordância com Jergens et al. (1992) que descrevem como infrequente a presença de ulceração gástrica focal nestes animais. Segundo estes autores, lesões endoscópicas da mucosa intestinal envolvem apenas 50% dos casos de DIIC canina.

Quanto aos escores endoscópicos do estômago e duodeno, a maioria do grupo afetado (76,5% e 70,5%, respectivamente) apresentou alterações leves

(mucosas com leve eritema, edema e tecido friável). No cólon, identificaram-se lesões de maior intensidade quando comparado às demais regiões, com apenas 45,45% dos animais com classificação 1. Lesões consideradas graves (escore 3) foram atribuídas em duas avaliações gástricas, nenhuma avaliação duodenal e três avaliações colônicas (11,11%; 0% e 27,27%, respectivamente). Uma explicação possível para este achado é que, em virtude da necessidade de preparo para procedimento e até de rejeição com a colonoscopia, a realização deste exame fica resguardada para animais com quadro clínico mais agressivo ou persistente. Entretanto, deve-se atentar para a possibilidade de estes animais poderem ter maior acometimento deste segmento intestinal em relação aos demais, sugerindo então um padrão que se aproxima mais da retocolite ulcerativa em humanos do que da doença de Crohn.

Os achados endoscópicos de nosso estudo permitem apenas indicar o acometimento gastrointestinal dos animais sem, entretanto, diagnosticar definitivamente a doença. Para tanto, se faz necessária a associação entre sinais clínicos, histórico e avaliação histopatológica das biópsias obtidas por meio deste procedimento.

No que tange a avaliação histopatológica, os processos linfoplasmocíticos foram os mais freqüentes em todas as regiões (70,58% no estômago, 60% no duodeno e 81,81% no cólon), assim como descrito na literatura (CRAVEN et al., 2004; TAMS, 2005). Jergens et al. (2009) relatam que todos os 48 animais avaliados apresentaram algum grau de inflamação linfocítica-plasmocítica em duodeno e/ou cólon.

Ainda em relação a esta avaliação, manteve-se o achado de lesões mais intensas em cólon quando comparado a estômago e duodeno, o que pode estar em concordância com a explicação previamente citada. No estômago, 67,32% das avaliações foram normais, enquanto que no duodeno foi em 55,33% e cólon, 38,63%. Conseqüentemente, observa-se maior incidência relativa de lesões no cólon, seguido pelo duodeno e estômago (61,35% para cólon, 41,99% para duodeno e 31,37% para estômago), independentemente da severidade da lesão. Embora os escores histológicos não tenham sido tão expressivos quanto se esperava (pelas limitações previamente discutidas), refletiram esta distribuição de lesões, com mediana superior no cólon em relação ao duodeno e estomago (6, 5 e 3; respectivamente). A análise da severidade das lesões mantém o cólon como sítio de

maior índice de lesões moderadas (15,90%) seguido pelo duodeno (4,66%) e estômago (3,92%). Apenas duas avaliações duodenais foram consideradas severas (1,33%). Entretanto, esta distribuição não foi observada por Burgener et al. (2008) que relatam maior severidade das alterações histopatológicas do duodeno em comparação ao cólon. Embora não tenhamos realizado a mesma classificação de Jergens et al. (2009), estes autores atribuíram inflamações moderadas a severas em 37 dos 48 cães avaliados, caracterizando processos mais severos do que os que encontrados em nosso estudo. Para Canani et al. (2007), 10 cães apresentaram alterações leves, seis com alterações moderadas e nenhum cão com alteração severa.

A análise dos subgrupos quanto ao escore histopatológico não mostrou diferença entre afetado I e afetado II nos três locais avaliados, o que sugere que este escore não seguiu a severidade do quadro indicada pelo escore clínico.

Não foram observadas correlações entre os escores endoscópicos e histopatológicos entre as diferentes regiões estudadas. Analisar esta relação foi um dos principais objetivos do estudo, visto que o exame endoscópico poderia apresentar-se como fator preditivo da análise histopatológica. Entretanto, os achados descritos mostram que apenas alguns animais apresentam concordância entre a severidade das lesões endoscópicas e histopatológicas. Na maioria dos casos, observou-se certa discrepância entre estas avaliações, como por exemplo, o animal 3 que apresentou escore endoscópico 1 e escore histopatológico 8, considerado elevado para nossa amostra. De forma semelhante, os animais 1 e 8 receberam escore 1 na avaliação endoscópica do cólon e escore 10 quando da avaliação histopatológica. Em contrapartida, 0 animal 19 recebeu escore 3 tanto para a análise endoscópica quanto para a histopatológica do cólon, sendo que a primeira nota é considerada alta (endoscopia com maior grau de alteração) e a segunda, baixa (visto que apresentou apenas três alterações considaradas leves). Esta ausência de correlação pode representar uma real falta de concordância entre os parâmetros, o que também foi descrito por Allenspach et al. (2007). Estes autores não observaram correlação entre estes escores como também a relação entre estes parâmetros e escore clínico de atividade da doença e evolução do caso. Já em 2006, Silva et al. observaram que 32,1% dos 167 pacientes com diarréia crônica e colonoscopias normais apresentaram lesões histológicas com valor diagnóstico. Desta forma, os autores recomendam a realização de biópsias seriadas mesmo sem

lesão endoscópica indicativa para o diagnostico preciso de afeções causadoras de diarréia crônica em humanos.

Uma outra explicação para este resultado é a ineficiência dos escores em traduzir corretamente as alterações observadas em cada exame. O componente subjetivo associado à falta de padronização entre os diversos estudos e entre os profissionais da área pode não só comprometer a utilização de escores como também a identificação deste problema.

Quanto às correlações entre escores endoscópicos e histopatológicos com valores laboratoriais, só foram observadas correlações moderadas entre PCR e escore histopatológico do cólon e escore histopatológico máximo.

A utilização de valores séricos de TNF-alfa não se mostrou um bom marcador laboratorial para a identificação de animais portadores de doença inflamatória crônica. Apenas um animal pertencente ao grupo controle apresentou valores quantificáveis desta citocina pró-inflamatória (14,83 pg/mL). Informações do fabricante obtidas no próprio manual do kit ELISA utilizado relatam que amostras provenientes de seis cães não apresentaram níveis superiores ao ponto mínimo de quantificação (7,8pg/mL). Acredita-se que o mesmo possa ter ocorrido com as amostras testadas.

Segundo Jergens et al. (2009), o TNF-alfa é um precursor da proteína C-reativa em processos inflamatórios e está envolvido na cascata de inflamação da DIIC. Em 1995, Mahmud et al. observaram níveis séricos elevados de TNF-α em pacientes acometidos por DIIC principalmente quando a doença encontrava-se ativa. Estes autores relatam correlação entre este marcador e índice clínico da doença e microalbuminemia, porém não observaram correlação com valores séricos de proteína C reativa. Na medicina veterinária, German et al. (2000) descreveram elevação de diversas citocinas inflamatórias em cães da raça Pastor Alemão com enteropatias (DIIC e supercrescimento bacteriano) incluindo TNF-alfa. Entretanto, estes autores utilizaram biópsias endoscópicas para a mensuração semiquantitativa através da técnica de PCR da expressão de mRNA desta citocina. Utilizando a mesma metodologia, De Majo (2008) não observaram maior expressão de TNF-alfa mRNA em cães com diarréia crônica quando comparados a cães sadios.

Similarmente ao presente estudo, McCann et al. (2007) não detectaram TNF-alfa quantificável em nenhum dos 16 cães com DIIC testados. Estes autores sugerem que valores séricos deste marcador não aumentem em cães com esta

afecção ou que o limite inferior do teste seja muito elevado para permitir sua detecção. Desta qualquer forma, os resultados obtidos não suportam a utilização de TNF-alpha sérico mensurado por ELISA para avaliação da atividade da doença em cães com DIIC.

Embora apenas cinco dos 20 animais afetados tenham apresentado elevação dos valores séricos de PCR, houve diferença estatisticamente significante entre os grupos afetados e controle, o que se manteve quando se comparou os subgrupos afetado I, afetado II e controle.Quando pareados, o grupo afetado II e o grupo controle obtiveram diferença estatisticamente significante. McCann et al. (2007) observaram elevação leve de PCR em 15 dos 16 animais incluídos no estudo enquanto que Jergens et al. (2010) relatou elevação em 23 dos 54 (43%) dos animais. Embora classificada como elevação leve por McCann et al. (2007), a média de PCR sérica foi de 12,8±7,0 mg/L, com valores de referência variando entre 0,001 e 4,415 mg/L. A elevação de proteína C reativa em animais com DIIC também é relatada por Steiner (2012). Entretanto, Allenspach et al. (2007) descrevem esta elevação em apenas sete dos 33 cães mensurados para PCR.

Além da correlação com escore clínico de atividade da doença, a PCR sérica também foi correlacionada ao escore histopatológico do cólon e escore histopatológico máximo ($p=0,037$ e $r=0,633$; $p=0,028$ e $r=0,491$, respectivamente). De forma semelhante, Jergens et al. (2003) descrevem a PCR como um marcador de severidade da doença, pois foi indiretamente correlacionada a escores clínicos e histopatológicos. Contrariamente ao observado por nós, Allenspach et al. (2007) e McCann et al. (2007) não observaram correlação desta proteína com índice clínico e histológico. Em desacordo com os achados de nosso estudo, estes autores concluem que, embora discretamente elevada na maioria dos cães, a PCR não reflete a severidade da doença tanto clínica quanto histopatologicamente. Entretanto, Allenspach et al. (2007) aceitam que, por terem dosado PCR em apenas 33 dos 70 animais incluídos no estudo, este dado pode estar subestimado. Associado a este fato, os mesmos autores encontraram diminuição significativa em todos os sete animais inicialmente caracterizados pela elevação de PCR, mostrando que esta proteína pode ser utilizada na monitorização do paciente após a instituição do tratamento, assim como recomendado por Vermeire et al. (2006).

A mensuração de S100A12 em cães é uma ferramenta recente e ainda com muito poucos dados clínicos para a comparação com os valores observados em

nosso estudo. A mensuração sérica deste marcador não mostrou diferença considerável entre os dois grupos testados, com medianas muito próximas (195,90 µg/L para o grupo afetado e 195,55 µg/L para o grupo controle). Esta característica manteve-se quando analisamos os subgrupos afetado I, afetado II e controle. Embora a mensuração fecal desta proteína também não tenha apresentado diferença estatisticamente significante entre os grupos, a mediana do grupo afetado foi maior em relação ao grupo controle, mostrando uma tendência de elevação deste parâmetro em animais afetados. Quando se analisou os subgrupos, os valores fecais de S100A12 não foram estatisticamente diferentes porém observou-se a mesma tendência relatada anteriormente, com valores de 17,15 ng/g para grupo afetado I; 80,30 ng/g para grupo afetado II e 12,27 ng/g para grupo controle.

Embora a calprotectina também seja uma proteína pertencente a família S100, observou-se comportamento diferente deste marcador em relação a proteína S100A12. Enquanto a mensuração sérica da calprotectina não se mostrou estatisticamente significante, a mensuração fecal apresentou diferença significante entre os grupos e subgrupos analisados. Infelizmente, não existem estudos clínicos avaliando esta afecção para comparação com nossos resultados.

Não foram observadas correlações entre os valores séricos e fecais tanto da calprotectina quanto da proteína S100A12. Embora tenham sido mensuradas as mesmas proteínas, esperava-se que valores fecais fossem mais específicos de inflamação intestinais quando comparados a valores séricos, que estariam sujeitos a elevação por diversos outras condições (VERMIERE et al., 2006). Entretanto, houve correlação entre os valores fecais de calprotectina e S100A12, assim como entre os valores séricos destes mesmos marcadores.

Em humanos, Canani et al. (2008) relatam a correlação entre calprotectina fecal e severidade da inflamação avaliada por colonoscopia. Para estes autores, a mensuração fecal da calprotectina mostrou-se a ferramenta mais precisa na avaliação de inflamação ativa da mucosa quando comparada a escores clínicos e marcadores séricos como taxa de sedimentação eritrocitária e PCR, com alta correlação com a graduação histológica. Contrariamente, no presente estudo não foram observadas correlações entre calprotectina ou S100A12 com PCR, escores clínicos, endoscópicos e histopatológicos.

Atualmente, a calprotectina e a S100A12 têm sido consideradas como marcadores promissores para a DIIC por serem altamente sensíveis e acessíveis.

Entretanto, os resultados deste estudo não foram tão animadores quanto se esperava. Uma explicação para isto pode estar relacionada ao fato de que a calprotectina é uma proteína derivada preferencialmente de neutrófilos, representando cerca de 60% das proteínas citosólicas de granulócitos (VERMEIRE et al., 2006). Sua presença nas fezes está diretamente relacionada à migração de neutrófilos no trato gastrointestinal. Em cães, sabe-se que as principais células envolvidas na DIIC são os linfócitos e plasmócitos; sendo os neutrófilos envolvidos em pequeno número de casos. Desta forma, o uso destes marcadores na veterinária podem ser mais restritos e com menor utilidade quando comparado a humanos.

Um fator interferente aos resultados fecais dos dois marcadores pode ter sido a metodologia utilizada neste estudo. A análise estatística inicial incorporava a média de três amostras consecutivas para cada animal. Entretanto, foi observada grande disparidade entre os valores adquiridos, o que não deve ser atribuído a erro metodológico visto que se trata de uma proteína estável a temperatura ambiente por período superior a sete dias e que foi mantida a temperatura -80°C até o momento da quantificação. Desta forma, optamos por utilizar apenas a média das duas amostras mais próximas e eliminar o valor mais discrepante dentre os três. Segundo nosso entendimento, estaríamos utilizando valores mais próximos aos do que acreditaríamos serem os exatos. No caso da S100A12, inicialmente obtivemos diferença estatística entre afetados e controles, o que não se manteve quando da seleção de apenas duas amostras. Mesmo assim, mantivemos esta metodologia por acreditar que fosse a mais condizente com nossas amostras. A escassez de estudos comparativos impede de definirmos qual metodologia reproduz melhor o comportamento destes marcadores e, evidentemente, estudos complementares devem ser realizados para confirmar ou não nossos achados.

Mensurações séricas de folato e cobalamina não foram estatisticamente significante entre os dois grupos. Entretanto, sabe-se que estes parâmetros não são utilizados como marcadores biológicos desta afecção e sim, como possíveis contribuintes na localização do segmento intestinal acometido (SIMPSON; JERGENS, 2011). Apenas três animais do grupo afetado apresentaram valores de folato inferiores aos normais enquanto que apenas um animal deste grupo apresentou valor aumentado de cobalamina. Batt (2009) descrevem que estes parâmetros podem contribuir para o diagnóstico de doenças do intestino delgado e que resultados normais não excluem doença intestinal.

O uso de marcadores laboratoriais na medicina veterinária pode representar um grande avanço do diagnóstico e tratamento dos animais acometidos por DIIC porém, deve-se ter em mente que nem todos os marcadores terão comportamento semelhante ao descrito na medicina. Embora muito próxima, a patofisiologia da doença tem suas particularidades nas diferentes espécies e alguns marcadores apresentam maior especificidade e sensibilidade a um determinado tipo específico da doença (doença de Crohn ou retocolite ulcerativa). A falta de conhecimento de padrões de resposta imunológica para os cães pode dificultar a definição de marcadores altamente correlacionados com a doença.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que:

1. A doença inflamatória intestinal é uma afecção com diversidade de sintomas crônicos sendo que êmese e diarréia são freqüentes nos animais afetados.
2. A associação de avaliação endoscópica e histopatológica são válidas para o diagnóstico da DIIC.
3. A proteína C-reativa e a proteína S100A12 fecal contribuem para a classificação da doença.
4. Marcadores laboratoriais podem ser utilizados como aditivos de uma avaliação global em pacientes com DIIC.

REFERÊNCIAS

ALLENSPACH, K.; LUCKSCHANDER, N.; STYNER, M.; SEIBOLD, F.; DOHERR, M.; AESCHBACH, D.; GASCHEN, F. Evaluation of assays for perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibodies and antibodies to Saccharomyces cerevisiae in dogs with inflammatory bowel disease. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 9, p. 1279-1283, Sep. 2004.

AOMATSU, T.; YODEN, A.; MATSUMOTO, K.; KIMURA, E.; INOUE, K.; ANDOH, A.; TAMAI, H. Fecal calprotectin is a useful marker for disease activity in pediatric patients with inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 56, n. 8, p. 2372-2377, Aug. 2011.

BATT, R. Diagnóstico laboratorial da doença intestinal em cães e gatos. **The Veterinary Focus**, v. 19, n. 1, p. 10-19, 2009.

BERGHOFF, N.; STEINER, J. M. Laboratory tests for the diagnosis and management of chronic canine and feline enteropathies. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 41, n. 2, p. 311-328, Mar. 2011.

BURGENER, I. A.; KONIG, A.; ALLENSPACH, K.; SAUTER, S. N.; BOISCLAIR, J.; DOHERR, M. G.; JUNGI, T. W. Upregulation of Toll-like receptors in chronic enteropathies on dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 3, p. 553-560, May-Jun. 2008.

BUNN, S. K.; BISSET, W. M.; MAIN, M. J.; GRAY, E. S.; OLSON, S.; GOLDEN, B. E. Fecal calprotectin: validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease . **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 14-22, Jul. 2001.

CANANI, R. B.; TERRIN, G.; RAPACCIUOLO, L.; MIELE, E.; SIANI, M. C.; PUZONE, C.; COSENZA, L.; STAIANO, A.; TRONCONE, R. Faecal calprotectin as reliable non-invasive marker to assess the severity of mucosal inflammation in children with inflammatory bowel disease. **Digestive and Liver Disease**, v. 40, n. 7, p. 547-553, Jul, 2008.

CAVE, N. J. Chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract of companion animals. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 51, n. 6, p. 262-274, Dec. 2003.

CERQUETELLA, M.; SPATERNA, A.; LAUS, F.; TESEI, B.; ROSSI, G.; ANTONELLI, E.; VILLANACCI, V.; BASSOTTI, G. Inflammatory bowel disease in the dog: differences and similarities with humans. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 9, p. 1050-1056, Mar, 2010.

COFFIN, C. S.; FRASER, H. F.; PANACCIONE, R.; GHOSH, S. Liver diseases associated with anti-tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) use for inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 17, n. 1, p. 479-484, Jan, 2011.

CRAVEN M.; SIMPSON, J. W.; RIDYARD, A. E.; CHANDLER, M. L. Canine inflammatory bowel disease: retrospective analysis of diagnosis and outcome in 80 cases (1995-2002). **The Journal of Small Animal Practice**, v. 45, n. 7, p. 336-342, Jul, 2004.

DAY, M. J.; BILZER, T.; MANSELL, J.; WILCOCK, B.; HALL, E. J.; JERGENS, A.; MINAMI, T.; WILLARD, M.; WASHABAU, R. Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. **Journal of Comparative Pathology**, v. 138, Feb-Apr, 2008. Supplement 1:S1-43.

DEJONG, N. S.; LEACH, S. T.; DAY, A. S. Fecal S100A12: a novel noninvasive marker in children with Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 12, n. 7, p. 566-572, Jul, 2006.

DEMAJO, M.; PUGLIESE, M.; GALIA, S.; MAZZULLO, G.; LA CAMERA, E.; FERA, M. T. Cytokine mRNA quantification in gastro-intestinal biopsies of dogs with idiopathic chronic enteropathies by Real Time RT-PCR: preliminary results. **Veterinary Research Communications**, v. 32, Suppl 1, p. S275-277, Sep, 2008.

ELWOOD, C. Best practice for small intestinal biopsy. **Journal of Small Animal Practice**, v. 46, n. 7-12, p. 315-316, Jul, 2005

ERHCHEN, J. M.; SUNDERKOTTER, C.; FOELL, D.; VOGL, T.; ROTH, J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n.3, p. 557-566, Sep, 2009.

FEFFERMAN, D. S.; FARREL, R. J. Endoscopy in inflammatory bowel disease: indications, surveillance and use in clinical practice. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n.1, p. 11-24, Jan, 2005.

FOGLE, J. E.; BISSETT, S. A. Mucosal immunity and chronic idiopathic enteropathies in dogs. **Compendium on Continuing Education for the practicing Veterinarian**, v. 29, n. 5, p. 290-302, May, 2007.

FUJIWARA, S.; YASANUGA, S.; NAKAYAMA, H.; DOI, K.; MASUDA, K.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Quantitative analysis of cytokines messenger RNAs in the duodenal mucosa in dogs with small intestinal inflammatory bowel disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 3, p. 327-336, 2002.

GASCHEN, L.; KIRCHER, P.; STUSSI, A.; ALLENSPACK, K.; GASCHEN, F.; DOHERR, M.; GRONE, A. Comparison of ultrasonographic findings with clinical activity index (CIBDAI) and diagnosis in dogs with chronic enteropathies. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 49, n. 1, p. 56-64, Jan-Feb, 2008.

GAYA, D. R.; MACKENZIE, J. F. Faecal calprotectin: a bright future for assessing disease activity in Crohn's disease. **QJM-Monthly Journal of the Association of Physicians**, v. 95, n. 9, p. 557-558, Sep, 2002.

GERMAN, A. J.; HALL, E. J.; DAY, M. J. Immune cell populations within the duodenal mucosa in dogs with enteropathies. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n.1, p. 14-25, Jan-Feb., 2001.

GERMAN, A. J.; HELPS, C. R.; HALL, E. J.; DAY, M. J. Cytokine mRNA expression in mucosal biopsies from german shepherd dogs with small intestinal enteropathies. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 45, n. 1, p. 7-17, Jan, 2000.

GUNAWARDANA, S. C.; JERGENS, A. E.; AHRENS, F. A.; NIYO, Y. Colonic nitrite and immunoglobulin G concentrations in dogs with inflammatory bowel disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 211; n. 3, p. 318-321, Aug, 1997.

HEILMANN, R. M.; SUCHODOLSKI, J. S.; STEINER, J. M. Development and analytic validation of a radioimmunoassay for the quantification of canine calprotectin in serum and feces from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 7, p. 845-853, Jul, 2008a.

HEILMANN, R. M.; SUCHODOLSKI, J. S.; STEINER, J. M. Purification and partial characterization of canine calprotectin. **Biochimie**, v. 90, n. 9, p. 1306-1315, Sep, 2008b.

HEILMANN, R. M.; SUCHODOLSKI, J. S.; STEINER, J. M. Purification and partial characterization of canine S100A12. **Biochimie**, v. 92, n. 12, p. 1914-1922, Dec, 2010.

HEILMANN, R. M.; LANEREI, D. J.; RUAUX, C. G.; GRÛTZNER, N.; SUCHODOLSKI, J. S.; STEINER, J. M. Development and analytic validation of a radioimmunoassay for the quantification of canine S100A12 in serum and fecal samples and its biological variability in serum from healthy dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 144, n. 3-4, p. 200-209, Dec, 2011.

JANECZKO, S.; ATWATER, D.; BOGEL, E.; GREITER-WILKE, A.; GEROLD, A.; BAUMGART, M.; BENDER, H.; MCDONOUGH, P. L.; MCDONOUGH, S. P.; GOLDSTEIN, R. E.; SIMPSON, K. W. The relationship of mucosal bacteria to duodenal histopathology, cytokine nRNA, and clinical disease activity in cats with inflammatory bowel disease. **Veterinary Microbiology**, v.128, n. 1-2, p. 178-193, Apr, 2008.

JERGENS, A. E. Underestimating gastrointestinal inflammation: implications for therapy. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 4, n. 3, p. 179-182, Sep, 2002.

JERGENS, A. E. Clinical assessment of disease activity for canine inflammatory bowel disease. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, n. 6, p. 437-445, Nov-Dec, 2004.

JERGENS, A. E. Clinical staging for severity of inflammatory bowel disease. **Proceedings of American College of Veterinary Internal Medicine Forum**, v. 19, p. 722-723, 2001.

JERGENS, A. E.; CRANDELL, J.; MORRISON, J. A.; DEITZ, K.; PRESSEL, M.; ACKERMANN, M.; SUCHODOLSKI, J. S.; STEINER, J. M.; EVANS, R. Comparison of oral prednisone and prednisone combined with metronidazole for induction therapy of canine inflammatory bowel disease: a randomized-controlled trial. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 2, p. 269-277, Mar-Apr, 2010.

JERGENS, A. E.; GAMET, Y.; MOORE, F. M.; NIYO, Y.; TSAO, C.; SMITH, B. Colonic lymphocyte and plasma cell populations in canine lymphocytic-plasmocytic colitis: an immunohistochemical and morphometric study. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 4, p. 515-520, Apr, 1999.

JERGENS, A. E.; MOORE, F. M.; HAYNES, J. S.; MILLES, K. G. Idiopathic inflammatory bowel disease in dogs and cats: 84 cases (1987-1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, n. 10, p. 1603-1608, Nov, 1992.

JERGENS, A. E.; SCHREINER, C. A.; FRANK, D. E.; NIYO, Y.; AHRENS, F. E.; ECKERSALL, P. D.; BENSON, T. J.; EVANS, R. A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 3, p. 291-297, May-Jun, 2003.

JERGENS, A. E.; SONEA, I. M.; O'CONNOR, A. M.; KAUFFMAN, L. K.; GROZDANIC, S. D.; ACKERMANN, M. R.; EVANS, R. Intestinal cytokine mRNA expression in canine inflammatory bowel disease: a meta-analysis with critical appraisal. **Comparative Medicine**, v. 59, n. 2, p. 153-162, Apr, 2009.

KAISER, T.; LANGHORST, J.; WITTKOWSKI, H.; BECKER, K.; FRIEDRICH, A. W.; RUEFFER, A.; DOBOS, G. J.; ROTH, J.; FOELL, D. Faecal S100A12 as a non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. **Gut**, v. 56, n. 12, p. 1706-1713, Dec, 2007.

LANGHORST, J.; ELSENBRUSH, S.; KOELZER, J.; RUEFFER, A.; MICHALSEN, A.; DOBOS, G. J. Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP and clinical indices. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 103, n. 1, p. 162-169, Jan, 2008.

LEIB, M. S.; BAECHTEL, M. S.; MONROE, W. E. Complications associated with 355 flexible colonoscopic procedures in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 5, p. 642-646, Sep-Oct, 2004.

LUCKSCHANDER, N.; ALLENSPACH, K.; HALL, J.; SEIBOLD, F.; GRONE, A.; DOHERR, M. G.; GASCHEN, F. Perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibody and response to treatment in diarrheic dogs with food responsive disease or inflammatory bowel disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 2, p. 221-227, Mar-Apr, 2006.

LUCKSCHANDER, N.; HALL, J. A.; GASCHEN, F.; FORSTER, U.; WENZLOW, N.; HERMANN, P.; ALLENSPACH, K.; DOBBLELAERE, D.; BURGENER, I. A.; WELLE, M. Activation of nuclear factor-kappaB in dogs with chronic enteropathies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 133, n. 2-4, p. 228-236, Feb, 2010.

MAHMUD, N.; O´CONNELL, M. A.; STINSON, J.; GOGGINS, M. G.; WEIR, D. G.; KELLEHER, D. Tumour necrosis factor-alpha and microalbuminuria in patients with inflammatory bowel disease. **European Journal of gastroenterology & hepatology**, v. 7, n. 3, p. 215-219, Mar, 1995.

MCCANN, T. M.; RIDYARD, A. E.; ELSE, R. W.; SIMPSON, J. W. Evaluation of disease activity markers in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n.11, p. 620-625, Nov, 2007.

NGUYEN VAN, N.; TAGLINGER, K.; HELPS, C.R.; TASKER, S.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; DAY, M. J. Measurement of cytokine mRNA expression in intestinal biopsies of cats with inflammatory enteropathy using quantitative real-time RT-PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, n. 3-4, p. 404-414, Oct, 2006.

PALTRINIERI, S. Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: the acute phase proteins. **Veterinary research communications**, v. 31, p. 125-129, Aug, 2007. Supplement 1

PETERS, I. R.; HELPS, C. R.; CALVERT, E. L.; HALL, E. J.; DAY, M. J. Cytokine mRNA quantification in histologically normal canine duodenal mucosa by real-time RT-PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, n. 1-2, p. 101-111, Jan, 2005.

POULLIS, A.; FOSTER, R.; NORTHFIELD, T. C.; MENDALL, M. A. Review article: faecal markers in the assessment pf activity in inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 16, n. 4, p. 675-681, Apr, 2002.

RIDYARD, A. E.; NUTTALL, T. J.; ELSE, R. W.; SIMPSON, J. W.; MILLER, H. R. Evaluation of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine mRNA expression within the colonic mucosa of dogs with idiopathic lymphocytic-plasmacytic colitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 86, n. 3-4, p. 205-214, Jul, 2002.

SIDLER, M. A.; LEACH, S. T.; DAY, A. S. Fecal S100A12 and fecal calprotectin as noninvasive markers for inflammatory bowel disease in children. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 14, n. 3, p. 359-366, Mar, 2008.

SILVA, J. G.; DE BRITO, T.; CINTRA DAMIÃO, A. O.; LAUDANNA, A. A.; SIPAHI, A. M. Histologic study of colonic mucosa in patients with chronic diarrhea and normal colonoscopic findings. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 40, n. 1, p. 44-48, Jan, 2006

SIMPSON, K. W.; JERGENS, A. E. Pitfalls and progress in the diagnosis and management of canine inflammatory bowel disease. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 41, n. 2, p. 381-398, Mar, 2011.

SOLEM, C. A.; LOFTUS-JR, E. V.; TREMAINE, W. J.; HARMSEN, W. S.; ZINSMEISTER, A. R.; SANDBORN, W. J. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic and radiographic activity in inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 11, n. 8, p. 707-712, Aug, 2005.

STEINER, J. M. **C-reactive protein**. Disponível em:http://vetmed.tamu.edu/gilab/service/assays/canine-c-reactive-protein. Acesso em: 12 feb. 2012.

TAMS, T. R. **Gastroenterologia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2005. 352p.

VERMEIRE, S.; VAN ASSCHE, G.; RUTGEERTS, P. Laboratory markers in IBD: useful, magic or unnecessary toys? **Gut**, v. 55, n. 3, p. 426-431, Mar, 2006.

XENOULIS, P. G.; PALCULICT, B.; ALLENSPACH, K.; STEINER, J. M.; VAN HOUSE, A. M.; SUCHODOLSKI, J. S. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 3, p. 579-589, Dec, 2008.

ZORAN, D. L. Gastroduodenoscopy in the dog and cat. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice,** v. 31, n. 4, p. 631-656, Jul, 2001.

WILLARD, M. D.; LOVERING, S. L.; COHEN, N. D.; WEEKS, B. R. Quality of tissue specimens obtained endoscopically from the duodenum of dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 4, p. 474-479, Aug, 2001.

WILLARD, M. D.; JERGENS, A. E.; DUNCAN, R. B.; LEIB, M. S.; MCCRACKEN, M. D.; DENOVO, R.; HELMAN, R. G.; SLATER, M. R.; HARBISON, J. L. Interobserver variation among histopathologic evaluations of intestinal tissues from dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 8, p. 1177-1182, Apr, 2002.

APÊNDICE

Apêndice A – Descrição da avaliação histopatológica inicial dos animais afetados – FMVZ/USP – São Paulo – 2012

Cão N°	EXAME REALIZADO	DIAGNÓSTICO HISTOPATOLOGICO INICIAL
1	Colono	Enterocolite linfoplasmocítica crônico-ativa moderada com microerosões associadas; tiflite crônica discreta a moderada
2	EGD	Gastrite crônica e moderada com reepitelização e regeneração glandular. Não foi possível identificar organismos *Helicobacter* spp. Leve enterite linfocítica plasmocítica
3	EGD	Gastrite crônica moderada com eosinófilos e neutrófilos; enterite linfocítica plasmocítica
4	EGD	Gastrite superficial subaguda leve; enterite linfoplasmocítica leve
5	EGD/Colono	Gastrite superficial subaguda com presença de eosinófilos e helicobacter spp.; enterocolite erosiva multifocal subaguda linfoplasmocítica com presença de eosinófilos
6	Colono	Ileíte linfoplasmocítica discreta associada a edema discreto; colite linfoplasmocítica discreta; tiflite linfoplasmocítica discreta; proctite fibrino-neutrofílica ulcerativa multifocal discreta
7	EGD	Gastrite aguda superficial leve com calcificação e helicobacter spp.; duodenite linfoplasmocítica discreta
8	EGD/Colono	Gastrite multifocal discreta linfoplasmocítica associada à moderada congestão; duodenite moderada linfoplasmocítica; ileíte linfoplasmocítica discreta a moderada; tiflite linfoplasmocítica discreta; colite linfoplasmocítica moderada; proctite linfoplasmocítica moderada com raros eosinófilos associados
9	EGD/Colono	Mucosa gástrica sem alteração (alguns fragmentos c/ fibrose superficial leve); duodenite linfoplasmocítica leve; ileíte linfoplasmocítica leve com aumento leve de eosinófilos; colite linfoplasmocítica leve com microerosões, fibrose, dilatação de criptas e distorção; proctite ativa microerosiva leve com hiperplasia de criptas
10	EGD	Epitelio gástrico, fovéolas regulares revestidas por células epiteliais s/ sinais de erosão, metaplasia ou rasamento. Alguns campos da lâmina própria c/ vasos congestos e áreas de hemorragia. Mucosa duodenal sem sinais de erosão, metaplasia ou rasamento. Na lâmina própria, discreto infiltrado inflamatório linfoplasmocítico.
11	EGD	Gastrite subaguda superficial leve com indícios de reepitelização (erosão prévia?); duodenite crônica linfoplasmocítica leve com presença de histiócitos e eosinófilos e reatividade de criptas
12	EGD/Colono	Mucosa gástrica (região de fundo) com discretas áreas de fibrose; mucosa gástrica (região de antro gástrico) dentro dos padrões de normalidade; ileíte linfoplasmocítica discreta com hiperplasia de placas de Peyer; colite microerosiva multifocal com áreas focais de fibrose, atrofia e discreto infiltrado linfoplasmocítico
13	EGD/Colono	Gastropatia erosiva com reepitelização e fibrose; enterite linfoplasmocítica discreta associada à moderada linfangiectasia; colon: hemorragia multifocal discreta a moderada e edema discreto
14	EGD/Colono	Gastrite superficial crônica com eosinófilos associados; Duodenite linfoplasmocítica discreta com eosinófilos; Colite erosiva linfoplasmocítica discreta a moderada com presença de eosinófilos
15	EGD/Colono	Mucosa gástrica dentro do valor de normalidade; Duodenite linfoplasmocítica moderada com moderado infiltrado inflamatório eosinofílico; Ileíte linfoplasmocítica discreta com presença de eosinófilos; Colite crônica discreta com eosinófilos e áreas focais de microerosão em atividade e reepitelização.
16	EGD	Gastrite erosiva regenerativa linfocítica moderada; Duodenite linfoplasmocítica discreta com eosinófilos
17	EGD	Edema e discreta congestão de mucosa gástrica; dicreta enterite aguda
18	EGD/Colono	Gastrite subaguda difusa discreta, Ileíte discreta, difusa, crônica com eosinófilos, exsudação fibrino-neutrofílica com macrófago (sugestiva de fundo de úlcera); duodeno insuficiente para análise
19	EGD/Colono	Mucosa gástrica de fundo dentro dos padrões de normalidade com presença de Helicobacter sp.; Gastrite crônica discreta associada a fibrose em antro gástrico; Duodenite linfoplasmocítica com presença de moderado infiltrado eosinofílico; Ileíte linfoplasmocítica discreta; Colite linfoplasmocítica discreta com microerosões em fase de reepitelização
20	EGD	Mucosa gástrica dentro dos padrões de normalidade; Enterite linfoplasmocítica discreta

EGD- esofagogastroduodenoscopia, Colono- colonoscopia

Apêndice B – Descrição dos valores séricos individuais de proteína C reativa – FMVZ/USP – São Paulo – 2012

	Cão No	Proteína C reativa (mg/l)		Cão No	Proteina C reativa (mg/l)
GRUPO AFETADO	1	11.5	GRUPO CONTROLE	21	6.3
	2	3.3		22	0.1
	3	5.4		23	0.3
	4	0.1		24	0.2
	5	0.7		25	0.1
	6	7.0		26	0.1
	7	8.1		27	3.2
	8	22.5		28	0.1
	9	1.6		29	5.2
	10	2.1		30	3.2
	11	1.3		31	0.1
	12	4.1		32	0.1
	13	0.2		33	4.1
	14	0.1		34	0.1
	15	44.0		35	0.1
	16	0.1		36	0.1
	17	0.1		37	4.6
	18	19.5		38	0.1
	19	1.3		39	0.1
	20	0.1		40	0.2

Apêndice C – Descrição dos valores séricos individuais da proteína S100A12 - FMVZ/USP – São Paulo – 2012

	Cão No	S100A12 sérico (µg/L)		Cão No	S100A12 sérico (µg/L)
GRUPO AFETADO	1	415,8	GRUPO CONTROLE	21	144,9
	2	368,2		22	1010,3
	3	369,3		23	498,4
	4	206,6		24	292,4
	5	137,6		25	444,5
	6	272,3		26	535,4
	7	794,0		27	452,8
	8	104,3		28	163,9
	9	84,5		29	220,7
	10	128,2		30	180,6
	11	1364,3		31	134,4
	12	387,5		32	104,9
	13	185,2		33	106,5
	14	634,1		34	299,9
	15	381,3		35	179,7
	16	113,6		36	350,2
	17	52,6		37	87,6
	18	148,1		38	210,5
	19	94,3		39	101,5
	20	131,9		40	101,0

Apêndice D – Descrição dos valores fecais médios da proteína S100A12 para cada cão do grupo afetado - FMVZ/USP – São Paulo – 2012

	Cão No	S100A12 fecal (ng/g)	Média S100a12 fecal ng/g)		Cão No	S100A12 fecal (ng/g)	Média S100a12 fecal (ng/g)
GRUPO AFETADO	1	3,8	3,8	GRUPO CONTROLE	21	20,5; 17,5; 1.399,0	479
	2	80,3	80,3		22	13480; 248,9; 163,5	206,2
	3	56,0; 26,5; 9,1	30,53		23	14,7; 9,9; 4,4	9,66
	4	6,2; 25,1; 18,7	16,66		24	3,4; 2,1; 2,8	2,76
	5	3,0; 3,2; 326,9	111,03		25	6,1; 15,6; 4,3	8,66
	6	3,6; 2,4; 2,5	2,83		26	68,7; 8,5; 78,5	51,9
	7	24,3; 94,2; 41,8	53,43		27	9,8; 14,7; 35,8	20,1
	8	68,6; 8,2; 301,1	125,96		28	12,9; 7,7; 20,3	13,63
	9	4,6; 2.314,0; 4.120,0	2146,2		29	9; 8,4; 9,7	9,03
	10	240,7; 1.227,0; 3,3	490,33		30	9,9; 13,1; 10,2	11,06
	11	4,9; 16,9; 434,5	152,1		31	29,2; 22,0; 2,4	17,86
	12	9,6; 304,7; 21,9	112,06		32	3,1; 24,9; 2,8	10,26
	13	6,3; 6,4; 2.438,0	816,9		33	19,4; 22,2; 37,6	26,4
	14	12,4; 410; 21,9	148,1		34	57,6; 12,9; 18	29,5
	15	4.622; 361,9; 6200	3727,96		35	1,8; 20,8;1612	544,86
	16	41,7; 14,8; 1654,0	570,16		36	29,3; 14,6; 11	18,3
	17	19,9; 28,2; 11,7	19,93		37	2230; 313,7; 2090	1544,56
	18	2505; 1360; 475,7	1446,9		38	4,1; 2,6; 3,1	3,26
	19	24; 687; 429,7	380,23		39	3,3; 3,2; 3,4	3,3
	20	64,3; 24,9; 3419	1169,4		40	377; 583; 305,9	421,96

Apêndice E – Descrição de valores séricos individuais de folato e cobalamina - FMVZ/USP – São Paulo – 2012

	Cão No	Folato (µg/l)	Cobalamina (ng/l)		Cão No	Folato (µg/l)	Cobalamina (ng/l)
GRUPO AFETADO	1	16,0	823,0	GRUPO CONTROLE	21	28,2	315,0
	2	10,8	354,0		22	18,3	294,0
	3	11,0	718,0		23	12,8	288,0
	4	18,0	255,0		24	6,3	209,0
	5	14,1	774,0		25	5,6	187,0
	6	23,4	477,0		26	15,8	995,0
	7	QNS	282,0		27	15,8	573,0
	8	2,8	397,0		28	10,0	481,0
	9	5,8	666,0		29	12,9	841,0
	10	6,9	520,0		30	14,9	721,0
	11	9,2	504,0		31	10,1	570,0
	12	13,9	441,0		32	14,6	>1000
	13	10,4	476,0		33	10,2	611,0
	14	11,1	895,0		34	15,1	605,0
	15	10,7	>1000		35	21,9	688,0
	16	16,1	299,0		36	12,9	235,0
	17	11,5	332,0		37	3,0	315,0
	18	8,2	421,0		38	7,7	479,0
	19	19,8	751,0		39	9,2	822,0
	20	9,6	688,0		40	1,4	285,0