

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Marco Aurélio Avendano Motta

**ESTUDO SOBRE PROGNÓSTICO NAS AFECÇÕES
DA MEDULA ESPINHAL EM CÃO**

Santa Maria, RS
2023

Marco Aurélio Avendano Motta

**ESTUDO SOBRE PROGNÓSTICO NAS AFECÇÕES DA
MEDULA ESPINHAL EM CÃO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Cirurgia e Clínica de Pequenos Animais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Mazzanti

Santa Maria, RS
2023

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Motta, Marco Aurélio Avendano
ESTUDO SOBRE PROGNÓSTICO NAS AFECÇÕES DA MEDULA
ESPINHAL EM CÃO / Marco Aurélio Avendano Motta.- 2023.
73 p.; 30 cm

Orientador: Alexandre Mazzanti
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2023

1. Extrusão de Disco 2. DNA livre 3. Neoplasias 4.
Neurocirurgia 5. Cão I. Mazzanti, Alexandre II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, MARCO AURÉLIO AVENDANO MOTTA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Marco Aurélio Avendano Motta

**ESTUDO SOBRE PROGNÓSTICO NAS AFECÇÕES
DA MEDULA ESPINHAL EM CÃO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Cirurgia e Clínica de Pequenos Animais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 25 de agosto de 2023.

Alexandre Mazzanti, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Diego Vilivaldo Beckmann, Dr. (UFSM)

Marcio Ferreira Poletto, Dr. (UFRGS)

Mauro Pereira Soares, Dr. (UFPeI)

Luis Felipe Dutra Correa, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, que me permitiu ter saúde e determinação, para que mais essa etapa da vida tenha sido vencida.

A minha mãe Josina Avendano Motta, pela torcida de sempre, pelas energias enviadas em forma de prece e orações, sempre com incentivo e estímulo de que tudo daria certo.

À minha esposa Ana Lúcia Farias de Paula, minhas filhas Mariana de Paula Avendano Motta e Manoela de Paula Avendano Motta, por abdicarem de momentos de lazer e entretenimento, cedendo esse tempo em família, para que eu realizasse meu objetivo, obrigado pela compreensão e apoio e por serem a família que eu sempre sonhei.

Agradecimento especial ao professor Dr. Alexandre Mazzanti, por em inúmeras vezes dedicar seu tempo a me orientar e ajudar com meus questionamentos e dúvidas, gratidão por ter acreditado na minha capacidade e potencial, demonstrando total confiança que o objetivo final seria alcançado.

Agradeço também aos médicos veterinários Prof. Dr. Alceu Gaspar Raiser, Dra. Marcia Cristina da Silva, Prof. Esp. João Manoel Chapon Cordeiro, Dr. Mauro Pereira Soares pelas orientações e aconselhamentos nos momentos de indecisão e dúvidas, saibam que vocês foram determinantes para minha resiliência e persistência, desejo a todos uma vida plena de saúde, paz e prosperidade.

“O caderno em branco chama-se tempo. E nós somos autores de todos os capítulos que se desenrolam por fatos vividos, no livro da Eternidade.”

(Chico Xavier)

RESUMO

ESTUDO SOBRE PROGNÓSTICO NAS AFECÇÕES DA MEDULA ESPINHAL EM CÃO

AUTOR: Marco Aurélio Avendano Motta
ORIENTADOR: Alexandre Mazzanti

As afecções da medula espinhal em cão podem ocorrer por diferentes causas, entre elas, a neoplasia e a extrusão do disco intervertebral (EDIV). Essas doenças podem afetar diferentes regiões da medula espinhal, cujo prognóstico pode variar de acordo com o grau de disfunção neurológica, pelo tipo de doença e, se neoplasia, a presença ou ausência de metástases. O artigo 1 da presente tese descreve um relato de caso de neoplasia do saco anal com metástase no corpo vertebral, medula espinhal e cauda equina e com prognóstico desfavorável. Os exames complementares de imagem evidenciaram envolvimento de tecidos ósseo e nervosos, alterações em linfonodos, sugerindo metástase. O exame histopatológico concluiu que era um carcinoma e que foi confirmado pela análise imuno-histoquímica, mostrando a importância desse exame na complementação dos achados histopatológicos. O artigo 2 teve o objetivo de estudar a quantificação do DNA livre no líquido cerebrospinal (LCE) e no plasma sanguíneo e utilizar a concentração como prognóstico no retorno à deambulação de cães paraplégicos em decorrência da extrusão do disco intervertebral (EDIV) (Hansen tipo I), submetidos à cirurgia descompressiva. Os 30 cães foram distribuídos em três grupos de igual número denominados: Grupo I (controle): hígidos; Grupo II: com paraplegia e presença de percepção à dor profunda (PDP); Grupo III: com paraplegia e ausência de PDP. Nos cães dos grupos II e III foi realizada a hemilaminectomia dorsolateral associada à fenestração do disco intervertebral afetado. Os cães do grupo I foram submetidos à coleta de sangue (plasma) e do LCE para a mensuração do DNA livre no dia 0 (antes da cirurgia) e dos grupos II e III nos dias 0, 30 e 90 dias após o procedimento cirúrgico. No grupo II, 100% dos cães retornaram à deambulação de forma satisfatória. No grupo III, em 40% dos cães a recuperação foi satisfatória, 40% mantiveram-se paraplégicos (insatisfatória) e 20% desenvolveram o andar espinhal. A concentração do DNA livre no LCE foi maior nos cães dos grupos II e III no tempo 0 e demonstrou ser mais sensível em detectar lesão na medula espinhal, quando comparado com os níveis encontrados no plasma. A concentração de DNA livre no plasma e no LCE dos cães dos GII e GIII continuou elevada aos 30 e 90 dias de PO, mesmo com a recuperação da deambulação. Pode-se concluir que é possível quantificar o DNA livre no LCE e no plasma, mas a concentração não deve ser utilizada como biomarcador no prognóstico para o retorno à deambulação de cães paraplégicos com ou sem PDP, ocasionado por EDVI TL após o tratamento cirúrgico.

Palavras-chave: Carcinoma perianal canino. Neoplasma. Metástase medula espinhal. Extrusão de disco.

ABSTRACT

STUDY ON PROGNOSIS IN DISORDERS OF THE SPINAL CORD IN DOG

AUTHOR: Marco Aurélio Avendano Motta
ADVISOR: Alexandre Mazzanti

Spinal cord disorders in dogs can occur due to various causes such as neoplasia and intervertebral disc extrusion (IVDE). These diseases can affect different regions of the spinal cord, the prognosis of which may vary according to the degree of neurological dysfunction, type of disease, and in cases of neoplasia, the presence or absence of metastases. Article 1 of this thesis describes a case report of neoplasm of the anal sac with metastasis in the vertebral body, spinal cord, and cauda equina, as well as the unfavorable prognosis. Complementary imaging exams showed involvement of bone and nerve tissues, and alterations in lymph nodes suggesting metastasis. The histopathological examination concluded that it was a carcinoma of a type confirmed by immunohistochemistry, showing the importance of this examination in complementing the histopathological findings. The objective of Article 2 was to quantify the free DNA in the cerebrospinal fluid (CSF) and blood plasma and to use the concentration as a prognosis for the return to walking of paraplegic dogs due to IVDE (Hansen type I) and submitted to decompressive surgery. The 30 dogs were divided into three groups of equal number: Group I (control): healthy; Group II: with paraplegia and presence of deep pain perception (DPP); Group III: with paraplegia and absence of DPP. In dogs from Groups II and III, dorsolateral hemilaminectomy was performed together with the fenestration of the affected intervertebral disc. Group I was submitted to blood (plasma) and CSF collection for measurement of free DNA at day 0 (before surgery) and Groups II and III at day 0 and 30 and 90 days postoperative. In Group II, 100% of the dogs returned to walking satisfactorily. In Group III, 40% of the dogs had satisfactory recovery, 40% remained paraplegic (unsatisfactory), and 20% developed spinal gait. The concentration of free DNA in the CSF was higher in dogs from Groups II and III at day 0, demonstrating CSF free DNA to be more sensitive in detecting spinal cord injury than the levels found in plasma. The concentration of free DNA in the plasma and CSF of dogs from Groups II and III remained high at 30 and 90 days postoperative, despite the recovery of ambulation. In conclusion, it is possible to quantify free DNA in CSF and plasma, but the concentration should not be used as a biomarker in the prognosis for the return to walking of paraplegic dogs with or without DPP, caused by IVDE TL after surgery.

Keywords: Canine perianal carcinoma. Neoplasm. Spinal cord metastasis. Disk extrusion.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	NEOPLASIAS DOS SACOS ANAIS EM CÃO.....	8
1.2	PROGNÓSTICO NAS NEOPLASIAS DOS SACOS ANAIS EM CÃO.....	9
1.3	DOENÇA DO DISCO INTERVERTEBRAL.....	9
1.4	DNA LIVRE CELULAR (cfDNA).....	13
1.4.1	DNA livre celular nas doenças neoplásicas.....	15
1.4.2	DNA livre celular nas doenças neurológicas.....	18
1.4.3	DNA livre celular nas doenças imunomediadas.....	18
1.4.4	DNA livre celular nas doenças infecciosas.....	18
1.5	BIOMARCADORES NO PROGNÓSTICO DA DOENÇA DO DISCO INTERVERTEBRAL EM CÃO.....	19
2	ARTIGO 1.....	21
3	ARTIGO 2.....	35
4	DISCUSSÃO.....	54
5	CONCLUSÃO.....	57
6	REFERÊNCIAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 NEOPLASIAS DOS SACOS ANAIS EM CÃO

As glândulas da região perianal estão localizadas na derme e ao redor do ânus (NIELSEN; AFTOSMIS, 1964). São comumente referidas como glândulas hepatóides, devido a sua semelhança morfológica celular com hepatócitos e consideradas glândulas sebáceas não secretoras no cão adulto (NIELSEN; AFTOSMIS, 1964; ESPLIN et al., 2003).

Os sacos anais representam divertículos cutâneos “cegos” que estão localizados em cada lado do ânus na posição de quatro e oito horas. Ao redor desses divertículos e, localizado no tecido conjuntivo, estão as glândulas sudoríparas apócrinas que esvaziam suas secreções no lúmen dos sacos anais. Nessa região, os tumores mais frequentes são o adenoma sebáceo perianal, adenocarcinoma sebáceo perianal e o adenocarcinoma apócrino da glândula do saco anal (TUREK; WITHROW, 2013).

Os adenomas de sacos anais são raros na Medicina Veterinária, porém os adenocarcinomas correspondem a 2% de todas as neoplasias cutâneas e 17% das neoplasias perianais caninas (BERROCAL et al., 1989). Um levantamento sobre raças de cães britânicos com adenocarcinoma do saco anal sugere que os Spaniels, em particular os Cocker Spaniels ingleses, estão em maior risco (POLTON et al., 2006). A média a idade dos cães diagnosticados com esta doença é de 10 anos (BENNETT et al., 2002). Estudos anteriores sugeriram uma predileção em fêmeas (ROSS et al., 1991), no entanto, uma distribuição aproximadamente igual entre os sexos tem sido relatada. Em cães machos, foi proposto que a castração pode estar associada ao aumento da incidência de adenocarcinoma de glândula apócrina do saco anal (POLTON et al., 2006).

O adenocarcinoma do saco anal é uma neoplasia maligna localmente invasiva e altamente metastática. Estudos demonstraram que seu potencial metastático gira em torno de 50% (intervalo de 46% a 96%) no momento da apresentação inicial (POLTON et al., 2007). Os gânglios linfáticos sublobares regionais e os gânglios pélvicos são os locais mais comuns de metástase no início do curso da doença (BENNETT et al., 2002).

As metástases ocorrem por via linfática para os linfonodos sublobares, sacrais e ilíacos, em decorrência da elevada vascularização linfática presente na

mucosa dos sacos anais (EMMS, 2005). O tumor primário do saco anal pode ser pequeno com grandes nódulos metastáticos. Os locais de metástases à distância, incluindo pulmões, fígado, baço, ossos e, menos comumente, coração, glândulas adrenais, pâncreas, rins e/ou mediastino, raramente podem desenvolver tardiamente (BENNETT, 2002).

1.2 PROGNÓSTICO NAS NEOPLASIAS DOS SACOS ANAIS EM CÃO

Em decorrência do comportamento invasivo e do elevado índice metastático, o prognóstico para cães com adenocarcinoma de sacos anais é considerado ruim. O tempo de sobrevida pode variar conforme o estadiamento tumoral e as modalidades terapêuticas instituídas (WITHROW; VAIL; PAGE, 2012).

O diâmetro tumoral é considerado fator prognóstico dos adenocarcinomas dos sacos anais, com um tempo médio de sobrevida de 292 dias em cães com tumores maiores de 2 cm de diâmetro comparado a 584 dias, em cães com tumores menores que 2cm. Evidências de metástase no momento do diagnóstico estão associadas ao tempo de sobrevida mais curto, quando comparado a cães com tumores localmente invasivos, sem sinais de metástase (POLTON et al., 2007).

1.3. DOENÇA DO DISCO INTERVERTEBRAL

As doenças compressivas da medula espinhal em cães têm sido descritas em diferentes raças, idades e com variados graus de deficiências neurológicas (CHERRONE et al., 2004; ITOH et al., 2008). Dentre essas afecções neurológicas, a doença do disco intervertebral (DDIV) é a afecção neurológica mais frequentemente descrita em cães (MC CARTNEY, 2007; FENN et al., 2020)

A função do disco intervertebral é promover estabilidade, mobilidade e flexibilidade para a coluna vertebral, absorver impactos e dissipar pressão (BERGKNUT et al., 2013). Estruturalmente, o disco intervertebral é caracterizado por dois tecidos integrados: o núcleo pulposo e o ânulo fibroso (TOOMBS; BAUER, 1998). O núcleo pulposo é a porção dinâmica e funcional do disco devido ao seu alto teor hídrico, atuando como um amortecedor hidráulico durante o movimento. Já o anel fibroso é rico em colágeno, no qual mantem a força e a tenacidade do disco (ROSENBLATT et al., 2014; FENN et al., 2020).

Na DDIV ocorre a degeneração do disco vertebral e esta pode ser de dois tipos, a degeneração condroide ou a fibroide (DEWEY; DA COSTA, 2016). Na metaplasia condroide o núcleo pulposos desidrata, suas células degeneram e toda a estrutura se torna distroficamente calcificada, o que altera a distribuição de pressão intradiscal, causando focos de estresse mecânico no anel fibroso. Com o tempo, podem ocorrer rupturas nos filamentos de colágeno que leva à extrusão do núcleo degenerado, o que ficou conhecido como Hansen tipo I (JEFFERY et al., 2013), que causa uma compressão aguda da medula espinhal (WHEELER; SHARP, 1999). A extrusão do disco é repentina e explosiva e geralmente acometem a coluna vertebral cervical e toracolombar (SMOLDERS et al., 2013). A região tracolombar é a mais acometida e representa 84 a 86% dos casos clínicos de DDIV nos cães (DEWEY; DA COSTA, 2016, OLBY et al., 2022).

A extrusão de disco é mais comum em cães de raças condrodistróficas, por exemplo, a dachshund, beagle, basset hound, shih tzu, pequinês e lhasa apso. A raça dachshund é a raça mais comumente acometida (DEWEY; DA COSTA, 2016). A metaplasia condroide nas raças condrodistróficas ocorre entre os dois a nove meses de idade (LORENZ et al., 2011), sendo que 75% ou mais de todos os discos intervertebrais sofrem degeneração em até um ano (TOOMBS; WATERS, 2007). Porém, os sinais clínicos de DDIV são principalmente relatados entre três a sete anos de idade (SMOLDERS et al., 2013).

A metaplasia fibróide é caracterizada pelo aumento do conteúdo colágeno do núcleo pulposos, que leva a um arqueamento do anel fibroso degenerado e enfraquecido, resultando em uma protrusão dorsal do disco intervertebral, conhecida como Hansen tipo II. Este tipo de degeneração afeta um número pequeno de discos e a mineralização é infrequente (BRISSON, 2010), ocorrendo geralmente na coluna cervical caudal e lombossacra de cães não condrodistróficos, como o pastor-alemão, dobermann, rottweiler, labrador retriever, dalmata e os sem raça definida, com mais de cinco anos (SMOLDERS et al., 2013).

A distinção entre os processos degenerativos supracitados que definem a herniação do disco intervertebral de raças de cães condrodistróficos (Hansen Tipo I) e não condrodistróficos (Hansen Tipo II) foi revisada recentemente. Comparações histopatológicas entre o disco intervertebral de raças de cães condrodistróficos e não condrodistróficos encontraram características de metaplasia condroide (condrificação

e substituição de células notocordais por condrócitos dentro do núcleo pulposo) em ambos os grupos de cães (KRANENBURG et al., 2013; HANSEN et al., 2017).

Além desses avanços nas descrições histológicas da doença do disco intervertebral (DDIV), avanços nas técnicas de diagnóstico, como a ressonância magnética (MRI), contribuíram para a expansão do grupo de condições que podem ser chamadas de tipos de DDIV em cães e gatos (FENN et al., 2020).

Com base nisso, atualmente a terminologia na literatura veterinária descrevem diferentes tipos de DDIV, como extrusão aguda de disco intervertebral, protrusão crônica de disco intervertebral, extrusão aguda de disco intervertebral com hemorragia epidural extensa, extrusão aguda não compressiva de núcleo pulposo, extrusão de núcleo pulposo hidratado, extrusão de disco intervertebral intradural/intramedular, extrusão traumática de disco intervertebral, embolismo fibrocartilagenoso (FENN et al., 2020).

Para Trotter (1996), a lesão na medula espinhal é atribuída a muitas causas: desarranjo mecânico dos elementos nervosos, alterações microvasculares e químicas que resultam em redução da perfusão, edema, isquemia, anóxia e a desmielinização ou perda axonal. Os eventos que ocorrem na lesão da medula espinhal são geralmente divididos entre primários e secundários (OLBY, 2010). Os eventos primários caracterizam por danos mecânicos que causam contusão e compressão (ROWLAND et al., 2008).

Na maioria das vezes, as agressões primárias não são suficientes para causarem danos permanentes, mas desencadeiam uma série de eventos secundários progressivos que agravam essas primeiras (RIVLIN; TATOR, 1979; BAGLEY, 2000; MALLEI et al., 2005). Os eventos secundários incluem hemorragia e destruição do leito microvascular, produção de radicais livres, rápidas mudanças na concentração intracelular de íons, excitotoxicidade e inflamação. O ponto final desta cascata destrutiva é muitas vezes a apoptose, que pode ocorrer por um longo período de tempo após a lesão (OLBY, 2010).

A lesão da vascularização local causa a formação de petéquias e trombozes microvasculares, que associadas ao edema e ao vaso-espasmo no local da injúria, resulta em uma acentuada hipoperfusão e isquemia do parênquima medular (TATOR; FEHLINGS, 1991). Após este período pode ocorrer reperfusão local, na qual pode aumentar a formação de radicais livres que exacerba os eventos secundários (OLBY, 2010).

A capacidade da medula espinhal em permitir o deslocamento depende da força dinâmica da compressão estabelecido por fatores como o diâmetro da medula espinhal em relação ao diâmetro do canal vertebral, a velocidade da extrusão ou protrusão do disco, e volume de massa compressiva. Na compressão progressiva crônica, como nas protrusões de Hansen tipo II e nas extrusões parciais de Hansen tipo I (de desenvolvimento lento), a força dinâmica é baixa e a medula espinhal pode compensar o grau de deslocamento antes que os sinais clínicos ocorram, muitas vezes representados apenas por dor (TOOMBS; WATERS, 2007).

No caso de extrusões agudas e graves de Hansen tipo I, a força dinâmica de compressão é frequentemente alta e os mecanismos compensatórios geralmente são superados (TOOMBS; WATERS, 2007). A lesão traumática aguda inicial da medula espinhal resulta em rompimento de membranas celulares, causando hemorragia, isquemia, e lesão neuronal e glial generalizada (OLBY, 2010). Danos progressivamente mais graves na medula espinhal provocam deficiências neurológicas, em sequência, de acordo, com o diâmetro das fibras.

Os exames físico e neurológico realizados são a chave para a determinação da localização das lesões (LECOUTEUR; CHILD, 1997, DEWEY; DA COSTA, 2016), que é fundamental para estabelecer os diagnósticos diferenciais e exames auxiliares para o diagnóstico definitivo (COSTA; MOORE, 2010, OLBY et al., 2022).

Para o auxílio ao diagnóstico da DDIV, faz-se necessário a realização da análise do líquido cefaloespinhal (LCE), do exame radiográfico simples, da mielografia, tomografia computadorizada (simples e contrastada) ou da ressonância magnética (COSTA; SAMII, 2010), sendo as duas últimas mais sensíveis para identificar as extrusões discais (BOS et al., 2012; NEWCOMB et al., 2012).

Para o diagnóstico da DDIV, as radiografias fornecem informações úteis, especialmente para identificar a degeneração ou a calcificação do disco intervertebral, mas com limitações. A mielografia aborda algumas das limitações das radiografias, mas foi amplamente suplantada pela imagem em corte transversal. A tomografia computadorizada com ou sem mielografia e ressonância magnética é atualmente mais utilizada e se tornou o foco da maioria dos estudos contemporâneos sobre doença do disco intervertebral (DA COSTA et al., 2020).

Atualmente, o principal indicador de prognóstico em animais com danos na medula espinhal toracolombar é a presença ou ausência de percepção de dor profunda nos membros pélvicos (OLBY et al., 2003). A presença desta indica um bom

prognóstico para recuperação funcional, enquanto que a ausência é interpretada como um sinal grave e desfavorável (OLBY et al., 2003; LEWIS et al., 2020). O prognóstico da doença ainda depende de diversos fatores como o início do aparecimento dos sinais clínicos e a duração dos mesmos (KAZAKOS et al., 2005).

O tratamento de cães com DDIV toracolombar pode ser clínico ou cirúrgico, dependendo do grau de disfunção neurológica (MOORE et al., 2020). Jeffery et al. (2013) relataram a preferência pela cirurgia descompressiva devido uma maior proporção de animais que retornam com a habilidade de caminhar, sendo que o tempo varia individualmente e depende da severidade e do local de lesão.

O tratamento cirúrgico é indicado principalmente para pacientes com recidiva do quadro ou progressão dos sinais, paraparesia não ambulatória, paraplegia com ou sem PDP (SHARP; WHEELER 2005). Os diferentes tipos de técnicas descompressivas têm sido descritas como a laminectomia Funkquist A, Funkquist B, laminectomia dorsal modificada (TROTTER, 1996), hemilaminectomia, fenestração e pediclectomia (LUBBE et al., 1994). Entre as várias técnicas de descompressão da medula espinhal, a hemilaminectomia dorsolateral pode promover melhora clínica significativa imediatamente após a cirurgia por permitir a remoção do material do disco intervertebral (MCKEE, 1992). Os objetivos do tratamento cirúrgico na DDIV são: a descompressão da medula espinhal, a remoção do material do interior do canal vertebral, a redução do edema, o alívio da dor e a prevenção de futuras extrusões (MOORE et al., 2020).

A taxa de sucesso pode variar de acordo com a terapia instituída sendo de 21% a 80% com o tratamento clínico e, entre 61% e 98,5% quando empregado o tratamento cirúrgico (OLBY et al., 2022). Dados atuais da literatura revelaram uma taxa de sucesso de 47,2% no retorno a deambulação para cães com extrusão de disco intervertebral que estavam paraplégicos e sem dor profunda com duração igual ou superior a 96h, submetidos ao tratamento cirúrgico (RIPPLINGER et al., 2023).

1.4. DNA LIVRE CELULAR (cfDNA)

A existência de DNA circulante livre de células (cfDNA) foi relatada pela primeira vez ao demonstrarem a presença de ácidos nucléicos livres no plasma sanguíneo de pessoas saudáveis (MANDEL; MÉTAIS, 1948). Esse DNA flutuante livre

está presente no componente livre de células de sangue total, como plasma e soro e nos demais fluidos corporais (JAHR et al., 2001).

A hipótese mais comum sobre a circulação do cfDNA no plasma de indivíduos saudáveis acredita que o cfDNA pode derivar principalmente da apoptose de células normais da linhagem hematopoiética (LUI et al., 2002) ou de outras células nucleadas (SWARUP; RAJESWARI, 2007) que, em circunstâncias fisiológicas, são eliminados pela infiltração de fagócitos, com níveis de cfDNA relativamente baixos em indivíduos saudáveis (DIAZ; BARDELLI, 2014).

Várias características do cfDNA sustentam esta hipótese: rápida rotatividade (TSUMITA; IWANAGA, 1963) e sua curta meia-vida na circulação sugerem um modelo de liberação contínua de células apoptóticas com uma consequente degradação rápida ou filtração (GIACONA et al., 1998; NAGATA et al., 2003; SNYDER et al., 2016). Consequentemente, o cfDNA é altamente fragmentado (cerca de 160 pb) (KARACHALIOU et al., 2017; STROUN et al., 2001a) este tamanho pode corresponder ao comprimento do DNA ocupado por um nucleossomo, como a unidade primária para organização espacial de DNA no núcleo (SNYDER et al., 2016).

Até o momento, apoptose e necrose não são os únicos mecanismos responsável pela presença de cfDNA circulante. Acredita-se que linfócitos e outros tipos de células vivas podem liberar DNA recém-sintetizado (STROUN et al., 2001b; VAN DER VAART et al., 2008) isso pode indicar um papel do cfDNA no funcionamento normal das células ou seu envolvimento em um tipo de intercomunicação ativa entre as células via liberação de ácidos nucleicos como uma via de sinalização intercelular (GARDINER, 2015).

Evidências recentes indicam um tráfego ativo de ácidos nucleicos entre as células por meio de mecanismos de transporte na membrana celular (HO, 2009), durante o desenvolvimento, remodelação epigenética, tecido regeneração e ajuste fino do sistema imunológico adaptativo. Além disso, esse mecanismo de tráfego pode estar envolvido no desenvolvimento de tumores e vigilância imunológica.

A fonte e as funções do cfDNA podem diferir entre diferentes condições fisiológicas e patológicas. cfDNA é liberado em circulação principalmente por mecanismos patológicos: pesquisa sobre cfDNA começou poucos anos depois da sua descoberta, quando altos níveis de cfDNA foram relatados primeiramente em pacientes com lúpus sistêmico eritematoso (TAN et al., 1966) e depois em pacientes com câncer (LEON et al., 1977; SHAPIRO et al., 1983).

A detecção de cfDNA circulante de origem tumoral, denominado como DNA tumoral circulante (ctDNA), inspirou os pesquisadores a procurar para outras moléculas de DNA: em 1997 cfDNA de origem fetal em plasma foi descoberto (LO et al., 1997).

Concentrações elevadas de cfDNA foram relatadas no plasma ou soro de pacientes com diferentes doenças, como acidente vascular cerebral (RAINER et al., 2003), trauma, infarto do miocárdio (CHANG et al., 2003) e diversos tipos de neoplasma, sugerindo a hipótese de que o cfDNA poderia estar em uma relação de *feedback* com a inflamação e sua liberação parece ativar uma resposta pró-inflamatória de citocinas (FRANK, 2016).

Mesmo que o cfDNA plasmático e sérico estejam caracterizados, o cfDNA também pode ser encontrado em outros fluidos, como a urina (CHAN et al., 2003) e líquido cerebrospinal (STARK et al., 2020; NIKANJAM et al., 2022). DNA livre celular da urina (ucfDNA) parece originar-se de necrose epitelial ou células apoptóticas que são liberadas ou em contato direto com o trato urinário ou pode derivar de cfDNA presente no sangue (SALVI et al., 2016). Em fato, Botezatu et al (2000) demonstraram que a barreira renal é parcialmente permeável particularmente ao DNA fragmentado derivado da circulação. O DNA livre celular da urina parece ser um biomarcador promissor (CASADIO et al., 2013), principalmente para cânceres derivados do geniturinário, mas também para outros cânceres não urológicos doença (GARZÓN et al., 2016).

1.4.1. DNA livre celular nas doenças neoplásicas

O DNA livre celular tornou-se particularmente intrigante na área oncológica, e recentemente a genotipagem do cfDNA no plasma está transformando o tratamento do câncer (ULRICH; PAWELETZ, 2018), mesmo que outras etapas são necessárias para aplicações efetivas na prática clínica.

Sabe-se há décadas que o cfDNA está presente em concentrações no sangue de pacientes com câncer e pacientes com tumores em estágio avançado apresentam níveis mais elevados do que aqueles em estágio inicial estágio (SOZZI et al., 2003; SHAO et al., 2015).

O DNA de células tumorais (ctDNA) representa apenas uma pequena fração (<1%) do total cfDNA (DIEHL et al., 2008; HOLDHOFF et al., 2009) e deriva de

tumores primários, circulando células tumorais (CTCs), micrometástases ou metástases (STROUN et al., 2000; ALIX-PANABIÉRES; PANTEL, 2016). Vários relatórios confirmaram que o ctDNA abriga células específicas relacionadas ao tumor, como mutações pontuais, número de cópias variações (CNVs), ampliações e alterações de metilação (CHENG et al., 2016) agindo como uma imagem circulante de uma doença específica (MATTOS-ARRUDA; CALDAS, 2016).

O crescente interesse no DNA tumoral deve-se apenas ao seu potencial uso como uma biópsia líquida que é uma grande promessa em uma ampla gama de aplicações clínicas, desde o diagnóstico precoce não invasivo até o prognóstico, detecção de doença residual mínima e previsão de resposta a tratamento do câncer (HEITZER; ULZ; GEIGL, 2015; LEWIS; VALLE; MCNAMARA, 2016; ULRICH; PAWELETZ, 2018). Mesmo que a biópsia cirúrgica continue a ser o padrão-ouro para diagnóstico e escolha do tratamento, apresenta algumas desvantagens: além de sua natureza invasiva, pode dar apenas um aspecto estático e espacial quadro limitado da doença no momento da cirurgia (DOMÍNGUEZ-VIGIL et al., 2018).

Por outro lado, além de sua técnica não invasiva, rápida e de baixo custo, o ctDNA permite um monitoramento longitudinal do câncer em tempo real e tem a capacidade de capturar a heterogeneidade do tumor (DOMÍNGUEZ-VIGIL et al., 2018).

Na detecção precoce de tumores, o ctDNA tem recebido atenção e como fonte potencial de biomarcadores para diferentes tipos de câncer. Uma aplicação promissora ótima parece ser a combinação de detecção de ctDNA com um painel de marcadores de câncer usados para programas de triagem (SALVI et al., 2016; ULRICH; PAWELETZ, 2018). Vários estudos sobre a capacidade do ctDNA de detectar mínimos resíduos da doença após a cirurgia ou tratamento ter sido feito em diferentes tipos de câncer, sugerindo seu alto prognóstico e preditivo poder de recidiva.

A genotipagem plasmática do ctDNA também pode ser usada para orientar a escolha de tratamento, monitorar de forma dinâmica a resposta às terapias, dar mais detalhes de possíveis causas genéticas de progressão, e esclarecer os mecanismos de resistência (DIAZ et al., 2012; MURTAZA et al., 2013; ULRICH; PAWELETZ, 2018). Estas aplicações parecem ser mais fáceis de alcançar e mais próximas de serem introduzida na prática clínica.

Na Medicina Veterinária, foram realizados estudos com o DNA livre celulares em cães apresentando diferentes tipos de tumores. Em um deles, foi quantificado o cfDNA no plasma de cães com tumores malignos (n=50) e benignos (n=13) (TAGAWA et al., 2019). Os autores observaram que as concentrações plasmáticas de cfDNA foram significativamente elevadas em cães com tumores malignos em comparação com cães com nódulos benignos ou controles saudáveis. O índice de integridade do DNA (relação entre fragmentos longos e curtos de cfDNA) foi significativamente menor em cães com tumores malignos em comparação com cães saudáveis controles. Níveis de cfDNA significativamente mais altos e um índice de integridade de DNA mais baixo foram observados em cães com linfoma ou leucemia, hemangiossarcoma e metástase à distância. Os níveis de cfDNA correlacionaram-se bem com o estágio clínico e tenderam a aumentar durante ou antes dos períodos de progressão da doença, sugerindo eficácia potencial do cfDNA para a detecção de metástases distantes e monitorar o estágio clínico da neoplasia.

Outro estudo foi desenvolvido em cães com tumor venéreo transmissível (TVT) na tentativa de utilizá-lo como biomarcador de diagnóstico, prognóstico e resposta terapêutica em tempo real (MOHAMADZAHERI et al., 2022). Os autores concluíram que o cfDNA pode ser proposto como biomarcadores no diagnóstico e prognóstico de cães com TVT e pode ser combinado com citologia para diagnosticar rapidamente o tumor.

Um estudo retrospectivo também foi desenvolvido com o objetivo de analisar os níveis de DNA livre celular em cães com neoplasia, que revelou maiores concentrações de cfDNA quando comparado com cães sem a doença. Foi notado que os cães com neoplasia e concentração plasmática de cfDNA acima de 1.247,5 µg/L tiveram menores taxas de sobrevivência do que aqueles com níveis abaixo deste limiar (KIM et al., 2021).

A detecção de DNA livre circulante também foi mensurado em 44 cadelas com tumor de mama e revelou que os fragmentos de cfDNA e o índice de integridade diferenciou significativamente entre cães com e sem neoplasma, além de permitir a distinção entre lesões benignas e malignas. Os autores concluíram que o estudo forneceu evidências de que o cfDNA pode ser um biomarcador para o diagnóstico de cadelas portadoras de nódulos mamários (BEFFAGNA et al., 2017).

1.4.2. DNA livre celular nas doenças neurológicas

A quantificação de DNA livre circulante foi investigada em 50 pacientes humanos com doença vascular isquêmica. Foi verificado um aumento significativo do DNA nuclear e mitocondrial, quando comparado com o grupo controle. A elevada concentração de DNA nuclear circulante até um mês após o acidente isquêmico foi positivamente correlacionado com a severidade da doença (TSAI et al., 2011).

Outro estudo avaliou a quantidade de DNA livre celular em pacientes humanos com trauma crânio-encefálico. Como resultado, foi verificado um aumento do DNA livre celular, quando comparado com o grupo controle e redução de 51% e 71% nas primeiras 24 e 48 horas, respectivamente. O estudo concluiu que o trauma crânio-encefálico foi associado a um elevado nível de cfDNA e a sua diminuição nas primeiras 24 horas auxiliou no prognóstico (MACHER et al., 2012).

1.4.3 DNA livre celular nas doenças imunomediadas

Após a descoberta de altos níveis de cfDNA no lúpus eritematoso sistêmico (LES), estudos em doenças autoimunes continuaram e os dados mostraram que o aumento da concentração de cfDNA parece estar correlacionado com a titulação de anticorpo e nefrite lúpica ativa (TRUSZEWSKA; FORONCEWICS; PACZEK, 2017).

Na Medicina Veterinária, foi realizado um estudo prospectivo com 28 cães apresentando anemia hemolítica imunomediada e observado uma maior concentração de DNA livre, quando comparado com o grupo controle. Os autores concluíram que a concentração de DNA livre celular foi associado com a mortalidade dos pacientes e pode ser um fator prognóstico para a doença (JEFFERY et al., 2017).

1.4.4 DNA livre celular nas doenças infecciosas

A quantificação do DNA livre celular foi realizada em 90 cadelas com piometra antes e após a ovariectomia. Foi observado que, entre os diferentes biomarcadores avaliados como proteínas inflamatórias agudas, proteína sérica amiloide A e proteína C reativa, o DNA livre celular foi o mais sensível biomarcador do processo inflamatório (AHN et al., 2021).

1.5 BIOMARCADORES NO PROGNÓSTICO DA DOENÇA DO DISCO INTERVERTEBRAL EM CÃO

Diferentes parâmetros são utilizados no prognóstico da doença do disco intervertebral, entre eles, a severidade dos sinais neurológicos, a velocidade do início, duração dos sinais e a localização da extrusão do disco intervertebral (OLBY et al., 2020). Embora esses parâmetros possam ser avaliados adequadamente em cães paraplégicos com preservação da dor profunda, quando há perda desse sinal, verifica-se que parte dos cães recuperaram a deambulação e outros não, sugerindo que as lesões possam ser definitivas ou temporárias na medula espinhal (OLBY et al., 2022).

Na tentativa de diferenciar as respostas quanto à recuperação funcional de cães paraplégicos sem percepção da dor profunda, tem-se investigado biomarcadores no plasma e no líquido cerebrospinal (OLBY et al., 2020). Diante disso, diferentes estudos foram realizados com diferentes biomarcadores, entre eles a proteína C reativa sérica (FOREMAN et al., 2021), neurofilamento de alto peso molecular (pNF-H) (NISHIDA et al., 2014), proteína TAU no líquido cerebrospinal (LCE) (ROERIG et al., 2013), proteína básica mielina, glicose, cálcio, lactato (WITSBERGER et al., 2012), GFAP, pNF-H e S100 β (OLBY et al., 2019), proteína básica de mielina no LCE (MBP) (LEVINE et al., 2010).

A avaliação dos biomarcadores do LCE como citologia, proteína básica de mielina (MBP) com ou sem creatina quinase (CK), proteína Tau, glutamato, matriz metaloproteinase-9 (MMP-9) e citocinas inflamatórias permitem uma análise mais sensível das alterações presentes no SNC, porém são mais invasivos e requerem anestesia geral.

Os biomarcadores mais promissores até agora estudados foram as proteínas estruturais do SNC, denominada proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e cadeia de neurofilamento pesado fosforilado (pNfH). Ambas podem ser mensuradas no plasma e no soro e fornecem informações sobre a gravidade da lesão do SNC. O GFAP foi o mais sensível em detectar o momento da lesão, quando comparado com o pNfH, auxiliando tanto na recuperação da deambulação, como no desenvolvimento de mielomalácia hemorrágica progressiva, com acurácia maior que 80% (OLBY et al., 2020).

Devido os resultados em alguns estudos com biomarcadores serem conflitantes, busca-se ainda um biomarcador que não tenha influência da duração da

lesão, com capacidade de mensurá-los no momento da apresentação, além de estabelecer prognóstico significativo para o tutor. Com base nisso, até o presente momento não há um teste rápido disponível que atingiu esse ponto de utilidade clínica (OLBY et al., 2020).

2. ARTIGO 1

Adenocarcinoma de Saco Anal com Metástase Vertebro-Medular em um Cocker Spaniel

Marco Aurélio Avendano Motta; Alexandre Mazzanti

Artigo publicado na ***Acta Scientiae Veterinariae***
51(Suppl 1):884 - doi: 10.22456/1679-9216.128954

Adenocarcinoma de Saco Anal com Metástase Vertebro-Medular em um Cocker Spaniel

Anal Sac Adenocarcinoma with Vertebromedullary Metastasis in a Cocker Spaniel

Marco Aurélio Avendano Motta¹ & Alexandre Mazzanti²

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Serviço de Neurologia e Neurocirurgia, (SNNV), Hospital Veterinário Universitário (HVU), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), Brasil.²Departamento de Clínica de Pequenos Animais, CCR, SNNV, HVU, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. CORRESPONDENCE: A. Mazzanti [alexamazza@yahoo.com.br – Tel.: +55 55 3220-9400 Ramal 24]. UFSM – Av. Roraima, n.1000, Hospital Veterinário – Serviço de Neurologia/Neurocirurgia. CEP: 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

ABSTRACT

Background: Several neoplasms can affect the perianal region, being the hepatic adenoma and the anal sac adenocarcinoma (ASAC), which is considered the most frequent. The ASAC is a malignant neoplasm originating from the secretory epithelium of the perianal apocrine glands and is rarely seen in veterinary medicine. The ASAC occurs mainly in adult to elderly canines. Patients may be asymptomatic or manifest discomfort and behavioral changes. In the presence of metastasis, the most frequent clinical signs are inappetence, coughing, dyspnea, and colorectal obstruction. Given this scenario, this paper aims to describe the clinical presentation, diagnostic examination, and necropsy findings of a Cocker Spaniel with ASAC and metastasis in the vertebral body, spinal cord, and cauda equina.

Case: An eight-year-old neutered male Cocker Spaniel (12 kg of body mass) with a clinical history of non-ambulatory paraparesis was evaluated. The patient also presented tenesmus,

difficulty to defecate, and the presence of nodules in the anal sac area. On the neurological examination, asymmetrical changes compatible with injury between L4-S3 were found. A complete blood count, serum biochemistry, and imaging exams such as plain radiography, abdominal ultrasonography (US), and magnetic resonance imaging (MRI) were requested. Blood count revealed anemia and neutrophilic leukocytosis and hypercalcemia. The liver showed increased echogenicity and thickened pancreas in the abdominal US scan. A slightly heterogeneous, vascularized mass with irregular borders was identified in the topographic region of the sublumbar lymph nodes; MRI images demonstrated an expansile formation in the ventral region of the lumbosacral spine, corresponding to the sublumbar lymph nodes and interruption of the cerebrospinal fluid at L5, suggestive of compression of the spinal cord and cauda equina. A presumptive diagnosis of perianal neoplasm with metastasis was made based on the complementary exams. The dog and referred for necropsy, which revealed a 4-cm tumor in the perianal region that invaded the pelvic canal. Multifocal nodules were present on the lung surface, liver, and kidneys, suggesting metastasis. On the cross-section of the spine, one could note the presence of the tumor in the vertebral bodies, spinal cord, and cauda equina from L5 to S3. Even with histopathological evaluation of the tumor, only the immunohistochemical analysis allowed us to confirm the anal sac adenocarcinoma.

Discussion: Adenomas and carcinomas are perianal gland neoplasms common in adult and elderly male dogs; the Cocker Spaniel breed is among the most affected. The clinical signs presented by the patient, such as tenesmus and difficulty in adopting the posture of defecation, are common, although neurological changes are rare. As for metastasis, carcinomas of the perianal region present high chances of metastasis to organs including the liver, kidneys, and lungs, both lymphatically and hematogenously, albeit few studies have related these factors to neurological alterations due to metastasis. We concluded that metastases from carcinomas to the spine must be considered a possible differential diagnosis in cases of patients presenting

clinical signs that are compatible with spinal cord compression and a history of previous neoplasm.

Keywords: canine perianal carcinoma, neoplasm, spinal cord metastasis

Descritores: carcinoma perianal canino, neoplasma, metástase medula espinhal

INTRODUÇÃO

A região perianal pode ser afetada por diferentes tipos de tumores, sendo o adenoma sebáceo perineal (tumor hepatoide) e o adenocarcinoma de saco anal (ASA) os mais frequentes [5,20].

O ASA é um neoplasma maligno que possui origem nas paredes dos sacos anais a partir do epitélio secretor. Em cães, apresenta 2% de incidência, quando comparado aos outros tipos de neoplasmas cutâneos [1,2]. Os animais diagnosticados com ASA geralmente são adultos e idosos, com maior prevalência entre sete a doze anos. O Cocker Spaniel, o Pastor Alemão e o Dachshund são as raças mais afetadas [4].

Os sinais clínicos de cães acometidos por ASA incluem ulceração tumoral, sangramento, dor/irritação perianal, prurido e tenesmo [1,16]. Os pacientes podem ser assintomáticos ou apresentar sinais de desconforto e alterações comportamentais, como lambedura excessiva da região perianal.

O ASA já foi relatado em cães, porém são poucos com metástase no corpo vertebral e estruturas nervosas [3,10]. Com base nisso, o presente trabalho tem por objetivo descrever a apresentação clínica e achados de necropsia de um Cocker Spaniel com ASA e metástase no corpo vertebral, medula espinhal e cauda equina.

CASO

Um canino macho castrado, Cocker Spaniel, com 8 anos de idade e 12 kg de massa corporal foi encaminhado para avaliação neurológica, com histórico de incoordenação e

fraqueza nos membros pélvicos (MP), mais evidente do lado esquerdo há aproximadamente dois meses. O cão também apresentava tenesmo e nodulações na área dos sacos anais (Figura 1A).

Ao exame neurológico foi observado estado mental e postura normais, paraparesia não ambulatória mais evidente no MP esquerdo (assimetria de sinais). Reações posturais (posicionamento proprioceptivo e salto) normais para os membros torácicos (MTs) e diminuídas no MP direito e ausentes no esquerdo. Reflexo flexor e tônus muscular normais para MTs, tônus muscular diminuído nos MPs, reflexos patelar e flexor diminuídos nos MPs. O reflexo perineal estava normal do lado direito e diminuído no lado esquerdo. À palpação epaxial, notou-se dor na região lombar e sacral. Essas alterações observadas no exame neurológico foram compatíveis com lesão entre L4-S3 da medula espinhal.

Com base no exame neurológico, foram incluídos no diagnóstico diferencial doença do disco intervertebral, neoplasia, doenças infecciosas e inflamatória. Foram solicitados exames complementares como hemograma, bioquímica sérica e exames de imagens como radiografia simples, ultrassonografia (US) abdominal e ressonância magnética (RM).

O hemograma apresentou discreta anemia e leucocitose por neutrofilia. Os exames bioquímicos (albumina, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, proteínas totais, uréia, creatinina) não apresentaram alterações. Foi feita a mensuração do cálcio sérico que estava acima do valor de referência para espécie (15,3mg/dl) (valor de referência: 8,9-12,6mg/dl) [1].

A radiografia simples da região lombar e sacral revelaram, na posição latero-lateral, contornos irregulares dos forames intervertebrais de L6-L7-S1, rarefação na lâmina óssea desde L6 até S3 e assoalho do canal vertebral de L6-L7 irregulares com rarefação óssea.

No US abdominal, o fígado se encontrava com ecogenicidade aumentada e o pâncreas (lobo direito) apresentou-se espessado. Foi identificada uma massa com 5,4 x 2,4 cm, discretamente heterogênea, vascularizada e com bordos irregulares, localizada em região

topográfica dos linfonodos sublobares (linfonodos mediais ilíacos, sacral e hipogástrico). Os demais órgãos abdominais e pélvicos não mostraram imagens fora dos padrões aceitáveis.

As imagens de RM ponderadas em T1 e T2 mostraram nos planos transversal, coronal e sagital uma formação expansiva, reativa pós-contraste (T1) (Gadolinio), caracterizada por uma massa tumoral no canal pélvico, a qual se estendia até a região perianal esquerda, com característica invasiva nos tecidos adjacentes (Figura 1B). Havia também uma estrutura multilobulada na região ventral da coluna lombossacral (linfonodos sublobares) que comprimia a vesícula urinária e o cólon descendente (Figura 1C). Na imagem sagital ponderada em T2, verificou-se uma interrupção do líquido cérebro-espinhal em L5, sugestivo de compressão da medula espinhal e cauda equina (Figura 1D).

Com base nos achados por imagem de RM, foi feito o diagnóstico presuntivo de neoplasma perianal com metástase nos linfonodos sublobares, corpo vertebral, medula espinhal e cauda equina. Devido ao prognóstico desfavorável e o grau de invasão tecidual pelo tumor, a tutora optou pela eutanásia e o animal foi encaminhado para necropsia.

Na necropsia, um tumor de aproximadamente 4 cm foi localizado na região perianal esquerda, de aspecto lobulado e coloração esbranquiçada. Os linfonodos sublobares apresentavam alteração de tamanho e coloração. Nódulos multifocais estavam presentes na superfície pulmonar com tamanho entre 0,5 e 4 cm. Estas lesões também foram observadas na superfície de corte dos pulmões. O fígado apresentava nodulações de 2 a 3 cm na face dorsal, ventral e intra-hepática e, nos rins, nódulos de aproximadamente 0,5 cm, sugestivo de metástase.

Na região ventral das vértebras lombares e sacrais, havia uma grande massa de aspecto lobulado e irregular, que se estendia de L5 até S3, correspondente aos linfonodos sublobares. A musculatura subsacral (em nível S3) estava infiltrada por material de coloração esbranquiçada com aspecto semelhante às lesões observadas na região perianal. Os corpos

vertebrais da região lombar e sacral (L5-S3) apresentavam focos de metástases com envolvimento da cauda equina.

Na avaliação histopatológica, com coloração de Hematoxilina e Eosina da massa tumoral foram observadas numerosas figuras mitóticas, com formações neoplásicas em lobos distintos e núcleo hipercromático em aumento de 200x (Figura 2A). A população celular das metástases nos linfonodos sublobares, corpo vertebral (Figura 2B), medula espinhal, raízes nervosas da cauda equina (Figura 2C), pulmões, fígado e rins apresentaram um padrão pouco diferenciado. Como diagnóstico presuntivo estabeleceu-se tumor de glândula hepatóide.

Amostras de tecidos, incluindo raízes nervosas em nível da vértebra S3 foram enviadas para imuno-histoquímica, sendo observada forte coloração em CAM 5.2 (Figura 2D), cujo diagnóstico estabelecido foi de adenocarcinoma de saco anal.

DISCUSSÃO

No caso descrito, o paciente acometido pelo ASA tinha oito anos de idade e, de acordo com a literatura, a idade pode variar entre sete e 12 anos [2,4,7]. Em relação a predisposição racial, Cocker Spaniel está entre as mais referenciadas [4,6,12,16].

Quanto aos exames laboratoriais, além da anemia e leucocitose com neutrofilia, verificou-se aumento do cálcio sérico (hipercalcemia), considerado, juntamente com a metastase de linfonodos regionais, as principais alterações em cães com adenocarcinoma de saco anal [1,6,19].

Dentre os sinais clínicos apresentados pelo paciente como tenesmo e dificuldade de adotar a postura para defecar já foram citados pela literatura [2]. Acerca dos sinais neurológicos, eles ocorreram em decorrência das metástases do neoplasma na medula espinhal e na cauda equina [14,15].

Os carcinomas da glândula perianal possuem grandes chances de metástases para

linfonodos sublobares [1,6,19] e, também, pela via hematogena, chegando a órgãos como os pulmões, fígado, rins e ossos, corpo vertebral, medula espinhal e cauda equina [1,10,13,16,17]. A metástase em casos de ASA pode ocorrer em aproximadamente 80% dos casos [15], sendo considerada a maior taxa em relação aos demais neoplasmas apócrinos cutâneos [13]. No presente relato, observou-se metástase em órgão abdominais e torácicos, além das vértebras, medula espinhal e cauda equina.

As metástases na coluna vertebral e tecidos nervosos pelo ASA em cão, no entanto, são pouco relatadas, sendo um caso publicado de metástase no canal vertebral e que causou paraplegia devido a compressão da medula espinhal [3]. Já, no presente relato, não se observou metástase no canal vertebral, mas infiltrado na medula espinhal e na cauda equina (Figura 1C), o que também ocasionou alterações neurológicas severas no paciente, enfatizando a relevância do presente relato.

Os exames complementares de imagem podem auxiliar no diagnóstico de neoplasmas, pois permitem estabelecer o estadiamento clínico, além de fornecer informações sobre a extensão da doença [10,11,19]. No caso relatado, as imagens radiográficas evidenciaram alterações de contorno e densidade óssea das vértebras desde L6 até S3. O US abdominal revelou imagem anormal dos linfonodos sublobares, o que salientou a suspeita de metástases. Já, a RM demonstrou, em imagem sagital ponderada em T1 pós-contraste, aumento dos linfonodos sublobares (Figura 1C) e, na imagem sagital ponderada em T2, interrupção do líquido cérebro-espinhal em nível de L5 até S3 (Figura 1D), sugestivo de compressão da medula espinhal e da cauda equina. Vale destacar, que a RM é considerada a modalidade de escolha para o diagnóstico por imagem em casos de envolvimento da medula espinhal [2,16,17], porém não acessível a todos os centros médicos veterinários.

Para o diagnóstico conclusivo das neoplasias perianais é necessária avaliação histopatológica e imuno-histoquímica [8]. Macroscopicamente, os carcinomas perianais podem

se apresentar como pequenos nódulos, de crescimento lento, indolores e com tempo de evolução de meses a anos. Esses nódulos podem ser isolados, múltiplos ou difusos e não aderidos às estruturas adjacentes [7,9].

As neoplasias de origem do saco anal podem apresentar três tipos distintos: sólido, roseta e tubular, ambos com pouca atividade mitótica e bem encapsulado [9,18]. As características histológicas das amostras do presente relato foram de alta atividade mitótica e população celular organizada formando lóbulos, sendo a suspeita inicial um neoplasma de origem hepatoide. Ao serem enviadas, no entanto, amostras para análise imuno-histoquímica, constatou-se um adenocarcinoma de saco anal, demonstrando assim, a importância da complementação da imuno-histoquímica ao exame histopatológico para o diagnóstico definitivo.

Conclui-se que metástases de carcinomas para a coluna vertebral e tecidos nervosos devem ser consideradas como possíveis diagnósticos diferenciais nos casos de pacientes que apresentem sinais neurológicos compatíveis com compressão medular e histórico de neoplasma prévio na região perianal. O diagnóstico de ASA e metástases foi com base nos exames de imagens (US e RM), dos achados de necropsia e, principalmente pela análise histopatológica e imuno-histoquímica do tumor.

Acknowledgements: We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the Master and Doctorate research grants and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) process number 310969/2021-2

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest.

REFERENCES

1. **Bennett P.F., DeNicola D.B., Bonney P. Glickman NW & Knapp D.W. 2002.** Canine anal sac adenocarcinomas: clinical presentation and response to therapy. *Journal Veterinary Internal Medicine.* 16(1): 100-104.
- 2.. **Berrocal A., Vos J. H., Van Den Ingh T. S. G. A. M., Molenbeek R. F., Van Sluijjs F. J. 1989.** Canine Perineal Tumours. *Journal of Veterinary Medicine.* 36 (10): 739-749.
3. **Brisson B. A., Whiteside D. P. & Holmberg D. L. 2004.** Metastatic anal sac adenocarcinoma in a dog presenting for acute paralysis. *Canadian Veterinary Journal.* 45(8): 678-681.
4. **Chaisiri N. & Pierrpoint C.G. 1979.** Steroid-receptor interaction in a canine anal adenoma. *Journal of Small Animal Practice.* 20(7): 405-416.
5. **Daleck C. R., Rodigueri S. M. & De Nardi A. B. 2016.** Neoplasia Perianais. In: Daleck C. R. & De Nardi A. B (Eds). *Oncologia em Cães e Gatos.* 2. ed. São Paulo: Roca, pp.600-614.
6. **Emms S.G. 2005.** Anal sac tumours of the dog and their response to cytoreductive surgery and chemotherapy. *Australian Veterinary Journal.* 83(6): 340-343.
7. **Ginn P.E., Mansell J.E.K.L. & Rakich P.M. 2007.** Skin and appendages. In: Caswell, J. & Williams K. (Eds). *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals.* Toronto: Elsevier Saunders, pp.553-781.
8. **Giuliano A., Dobson J. & Mason S. 2017.** Complete resolution of a recurrent canine anal sac squamous cell carcinoma with palliative radiotherapy and carboplatin chemotherapy. *Veterinary Science.* 4(3): 45.
9. **Goldschmidt M. H., Dunstan R.W. & Stannard A.A. 1998.** Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals. In: *WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals.* Washington: Armed Forces Institute of Pathology, pp 38-40.

10. Goldshimidt M. H. & Zoltowski C. 1981. Anal sac gland adenocarcinoma in the dog: 14 cases. *Journal of Small Animal Practice*. 22(3): 119-128.
11. Jark P. C., Huppes R. r., Sierra O. R., Maria B. P., Raposo T. M. M., Werner J. & De Nardi A. B. 2015. Carcinoma de glândulas apócrinas com comprometimento de vasos linfáticos de la dermis: reporte de dos casos. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 47(2): 251-254.
12. Jark P.C., Grandi F., Rossetto V.J.V., Machado L.H.A., Amorim R.L. & Ranzani J.J.T. 2010. Aspectos Gerais das Neoplasias Perianais em Cães. *MEDVEP*. 8(24): 116-122.
13. Javanbakht J., Tavassoli A., Sabbagh A., Hassan M.A., Samakkhah S.A., Shafiee R., Lakzian A., Ghalee V.R. & Gharebagh S.S. 2013. Evaluation of an anal sac adenocarcinoma tumor in a Spitz dog. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 3(1): 74-78.
14. Jones T.C., Hunt R.D. & King N.W. 2000. Sistema digestivo. In: *Jones T.C. (Ed.). Patologia Veterinária*. Barueri: Manole, pp. 1063-1073.
15. Kesselr M. 2014. Perianal tumors. *World Small Animal Veterinary Association World (WSAVA) Congress proceedings, 30th, Cape Town, South Africa*.
16. Maita K. & Ishida, K. 1975. Structure and development of the perianal gland of the dog. *Nihon Juigaku Zasshi*. 37(4): 349-356.
17. Nielsen S.W. & Aftosmis J. 1964. Canine perianal gland tumours. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 144(1): 127-135.
18. Pradel J., Berlato D., M Dobromylskyj M. & Rasotto R. 2018. Prognostic significance of histopathology in canine anal sac gland adenocarcinomas: Preliminary results in a retrospective study of 39 cases. *Veterinary Comparative Oncology*. 16(4): 518-528.
19. Repasy A.B., Selmic L.E. & Kisseberth W.C. 2022. Canine apocrine gland anal sac adenocarcinoma: a review. *Topics in Companion Animal Medicine*. 50:100682.
20. Silva J., Peleteiro M. & Correia, J. 2002. Hiperplasia e tumores das glândulas

hepatóides: estudo retrospectivo (1995-2001). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*.
118: 17-46.

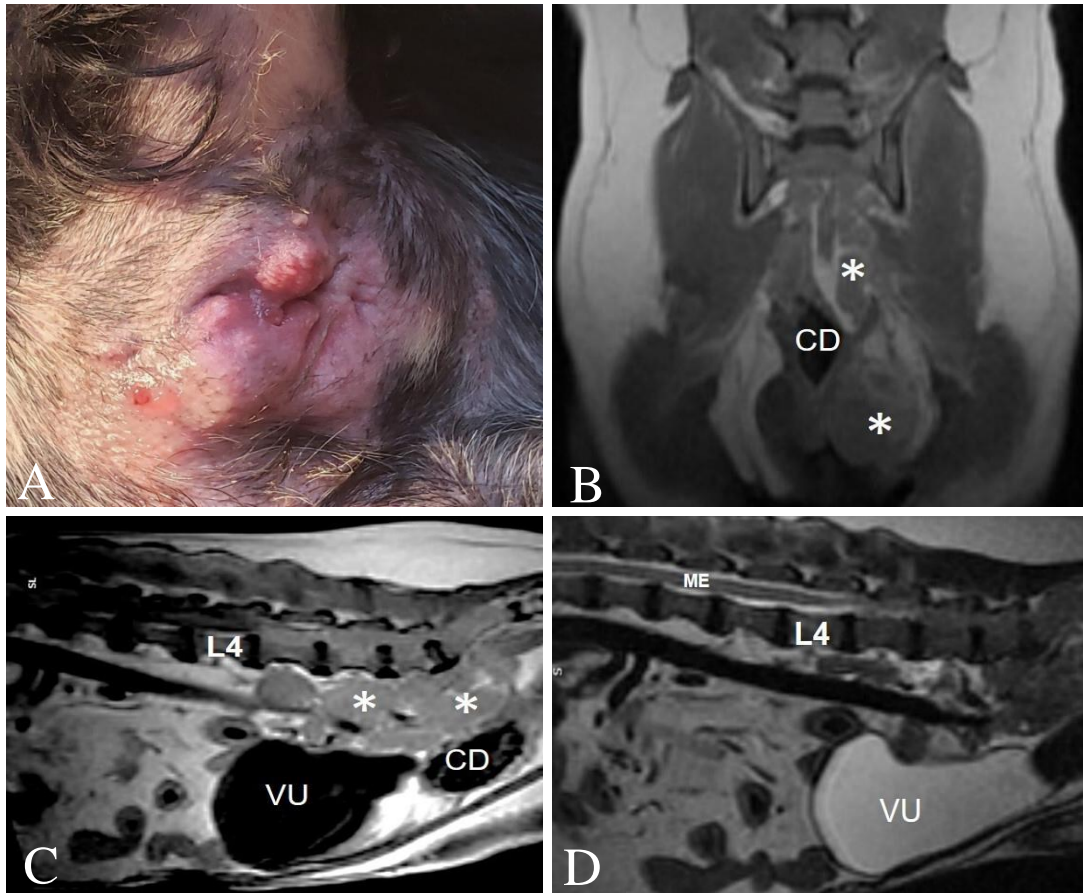


Figura 1. Adenocarcinoma de saco anal com metástase vértebro-medular em um Cocker Spaniel. Em A, nota-se a presença de nodulações na região perianal. Em B, imagem da ressonância magnética (RM) em corte coronal ponderada em T1 pós-contraste demonstrando a expansão do adenocarcinoma de saco anal (asteriscos) para o canal pélvico e íntimo contato com o cólon descendente (CD). Em C, imagem sagital da RM ponderada em T1 pós-contraste indicando o aumento dos linfonodos sublobares (asteriscos), comprimindo ventralmente a vesícula urinária (VU) e cólon descendente (CD). Em D, imagem sagital da RM ponderada em T2 ilustrando a interrupção do líquido cérebro-espinhal em nível de L5, sugestivo de compressão da medula espinhal (ME).

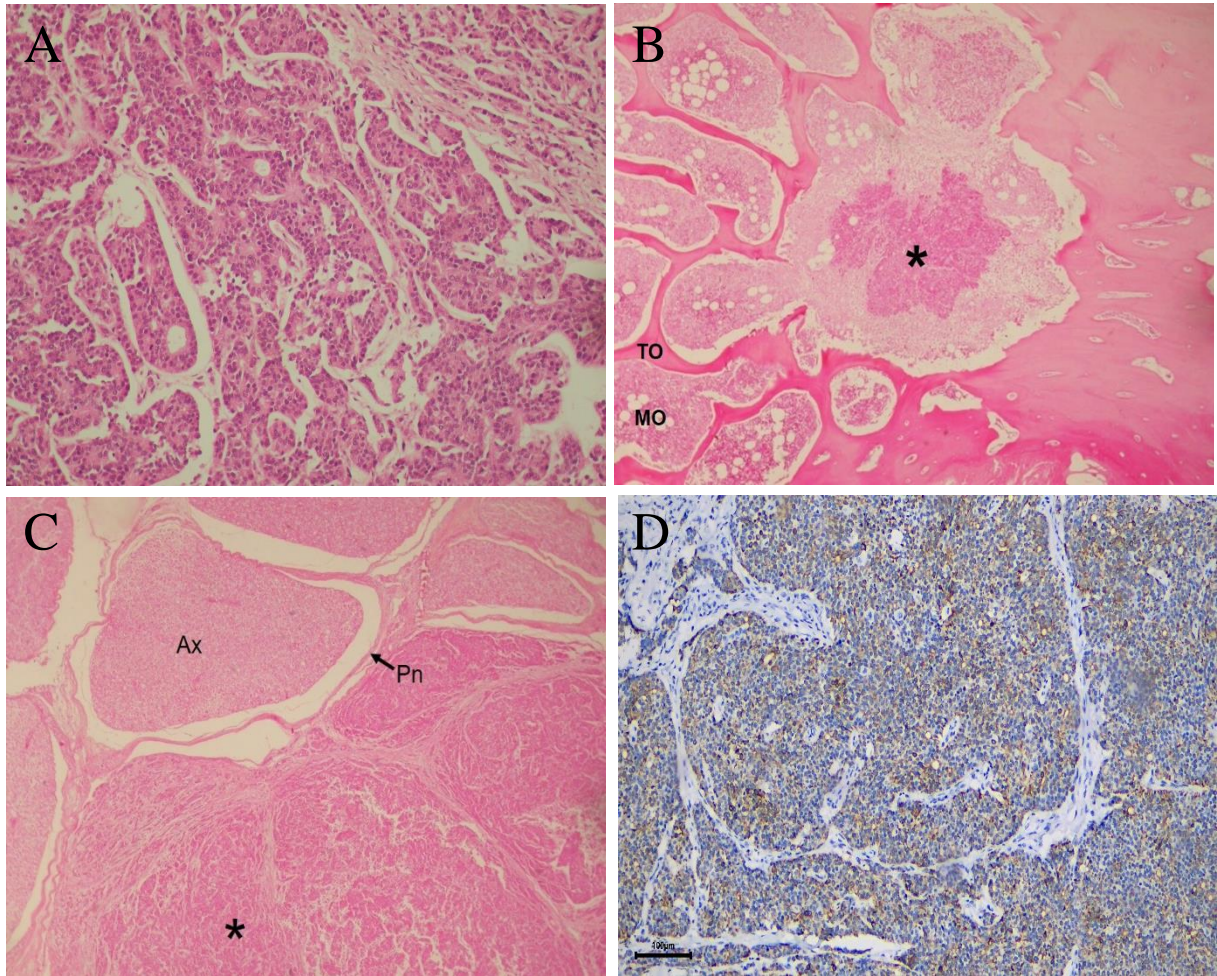


Figura 2. Fotomicrografia do adenocarcinoma de saco anal com metástase vértebro-medular, coloração Hematoxilina e Eosina. Em A, nota-se no tumor perianal no aumento de 200x, formação neoplásica lembrando cordões de hepatócitos. Em B, com aumento 200x secção do corpo vertebral de S3 acúmulo de células neoplásicas indicando metástase (asterisco). Em C, com aumento 200x nota-se na raiz nervosa da cauda equina em nível de S3, focos de metástase com destruição neural (asterisco). Em D, análise imuno-histoquímica da raiz nervosa da cauda equina em nível de S3 e presença do adenocarcinoma de saco anal. Observa-se forte imunocoloração para CAM 5.2, aumento de 400x. TO: trabéculas ósseas; MO: medula óssea; Ax: axônios; Pn: perineuro.

3. ARTIGO 2

Concentração de DNA livre no pós-operatório como prognóstico no retorno à deambulação de cães paraplégicos secundário à extrusão de disco intervertebral (Hansen tipo I)

Marco Aurélio Avendano Motta, Alexandre Mazzanti

Artigo submetido à Ciência Rural

Concentração de DNA livre no pós-operatório como prognóstico no retorno à deambulação de cães paraplégicos secundário à extrusão de disco intervertebral (Hansen tipo I)

Postoperative free DNA concentration as a predictor of return to ambulation in paraplegic dogs secondary to intervertebral disc extrusion (Hansen type I)

Marco Aurélio Avendano Motta, Alexandre Mazzanti

RESUMO

O objetivo deste estudo foi quantificar o DNA livre no líquido cerebrospinal (LCE) e no plasma sanguíneo e utilizar, no pós-operatório, a concentração como prognóstico no retorno à deambulação de cães paraplégicos em decorrência da extrusão do disco intervertebral (EDIV) (Hansen tipo I) e submetidos à cirurgia descompressiva. Os 30 cães foram distribuídos em três grupos de igual número denominados: Grupo I (controle): hígidos; Grupo II: com paraplegia e presença de percepção à dor profunda (PDP); Grupo III: com paraplegia e ausência de PDP. Nos cães dos grupos II e III foi realizada a hemilaminectomia dorsolateral associada à fenestração do disco intervertebral afetado. Os cães do grupo I foram submetidos à coleta de sangue (plasma) e do LCE para a mensuração do DNA livre no dia 0 (antes da cirurgia) e dos grupos II e III nos dias 0, 30 e 90 dias após o procedimento cirúrgico. No grupo II, 100% dos cães retornaram à deambulação de forma satisfatória. No grupo III, em 40% dos cães a recuperação foi satisfatória, 40% mantiveram-se paraplégicos (insatisfatória) e 20% desenvolveram o andar espinhal. A concentração do DNA livre no LCE foi maior nos cães dos grupos II e III no tempo 0 e demonstrou ser mais sensível em detectar lesão na medula espinhal, quando comparado com o níveis encontrados no plasma. A concentração de DNA livre no plasma e no LCE dos cães dos GII e GIII continuou elevada aos 30 dias e 90 dias de PO, mesmo com a recuperação da deambulação. Pode-se concluir que é possível quantificar o DNA livre no LCE e no plasma,

mas a concentração no pós-operatório não deve ser utilizada como biomarcador no prognóstico para o retorno à deambulação de cães paraplégicos com ou sem PDP, ocasionado por EDVI TL após o tratamento cirúrgico.

Palavras-chave: extrusão de disco, DNA livre, neurologia, cirurgia.

ABSTRACT

This study aimed to quantify the free DNA in the cerebrospinal fluid (CSF) and blood plasma, and to use the concentration during the postoperative period as a prognosis in the return to ambulation of paraplegic dogs due to intervertebral disc extrusion (IVDE) (Hansen type I) and submitted to decompressive surgery. The 30 dogs were divided into three groups of equal number: Group I (control): healthy; Group II: with paraplegia and presence of deep pain perception (DPP); Group III: with paraplegia and absence of DPP. In dogs from Groups II and III, dorsolateral hemilaminectomy was performed together with the fenestration of the affected intervertebral disc. Group I was submitted to blood (plasma) and CSF collection for measurement of free DNA on day 0 (before surgery) and Groups II and III on day 0 and 30 and 90 days postoperative. In Group II, 100% of the dogs returned to walking satisfactorily. In Group III, 40% of the dogs had satisfactory recovery, 40% remained paraplegic (unsatisfactory), and 20% developed spinal gait. The concentration of free DNA in the CSF was higher in dogs from Groups II and III at day 0, demonstrating CSF free DNA to be more sensitive in detecting spinal cord injury than the levels found in plasma. The concentration of free DNA in the plasma and CSF of dogs from Groups II and III remained high at 30 and 90 days postoperative, despite the recovery of ambulation. In conclusion, it is possible to quantify free DNA in CSF and plasma, but the concentration in the postoperative period should not be used as a biomarker in the prognosis for the return to walking of paraplegic dogs with or without PDP caused by IVDE TL after surgery.

Keywords: Disk Extrusion, cell-free DNA, neurology, surgery.

INTRODUÇÃO

O prognóstico quanto a recuperação da deambulação em cães paraplégicos ocasionado pela extrusão do disco intervertebral (EDIV) toracolombar (TL) baseia-se, principalmente, na presença ou ausência de percepção à dor profunda (PDP) nos membros pélvicos e cauda (AIKAWA et al., 2012; OLBY et al., 2022). Para cães que apresentam a PDP, o prognóstico é favorável e a taxa de retorno à deambulação varia de 60 a 93% (OLBY et al., 2022). Em cães paraplégicos com a ausência de PDP, a taxa de recuperação é menor e varia entre 21% e 61% (JEFFERY et al., 2016; OLBY et al., 2022; RIPPLINGER et al., 2023).

A determinação do prognóstico quanto ao retorno à deambulação, com base apenas na perda da PDP é subjetiva e a interpretação pode variar entre os examinadores (HEBLINSKI E SCHMÖKE, 2018). Além disso, verifica-se que parte dos cães que perdem a PDP recuperam a deambulação e outros não, sugerindo que as lesões possam ser temporárias ou definitivas na medula espinhal (OLBY et al., 2020). Dessa forma, torna-se importante associar outros métodos que permite auxiliar no prognóstico (OLBY et al., 1999; NISHIDA et al., 2014; CHAMISHA et al., 2015).

A extrusão do disco intervertebral causa contusão e compressão da medula espinhal (JEFFERY et al., 2013), que desencadeia uma série de eventos secundários progressivos (BAGLEY, 2000; MALLEI et al., 2005) e que pode culminar com a morte celular (OLBY, 2010). Durante o processo de morte celular, seja por apoptose ou necrose, há a liberação de DNA livre na circulação e o seu nível elevado pode estar associado à gravidade da doença. Por esse motivo, a sua mensuração tem sido estudada como um possível biomarcador capaz de auxiliar na severidade e na previsão de prognóstico em diversas doenças (HA, et al., 2011; BURNETT et al., 2016).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi quantificar o DNA livre no LCE e no plasma e utilizar, no pós-operatório, a concentração como prognóstico no retorno à deambulação de cães paraplégicos causados pela a extrusão do disco intervertebral toracolombar (Hansen tipo I) com ou sem a presença de PDP e submetidos à hemilaminetomia toracolombar.

MATERIAIS E METODOS

Foram utilizados 30 cães, machos e fêmeas, adultos, de diversas raças e pesos, proveniente da rotina do Serviço de Neurologia e Neurocirurgia do Hospital Veterinário Universitário da UFSM. Os animais foram distribuídos em três grupos de igual número denominados de: Grupo I (GI) – cães hígdos que foram submetidos ao procedimento cirúrgico eletivo de ovariectomia ou orquiectomia; Grupo II (GII) - cães que estavam paraplégicos devido à EDIV TL com presença de PDP e Grupo III (GIII) - cães que estavam paraplégicos devido à EDIV TL com perda da PDP.

Os exames clínicos, neurológicos e laboratoriais foram realizados em todos os animais deste estudo (GI, GII e GIII). O exame neurológico foi constituído de observações gerais (estado mental), da avaliação da locomoção, das reações posturais, dos nervos cranianos, dos reflexos segmentares espinhais, da palpação epaxial (hiperestesia) e da percepção à dor profunda (DEWEY & DA COSTA, 2016).

Na primeira consulta, foram realizados exames laboratoriais, como o hemograma, a contagem de plaquetas, a dosagem sérica da uréia, da creatinina, da alanina aminotransferase (ALT), da fosfatase alcalina (FA), glicose, proteínas totais (PT) e albumina.

Os cães do grupo I foram submetidos à coleta de sangue (plasma) e do LCE para a mensuração do DNA livre no dia 0 (antes da cirurgia) e dos grupos II e III nos dias 0, 30 e 90 dias de pós-operatório (PO). A colheita do LCE foi realizada, em todos os grupos, por meio da punção das cisternas magna e lombar (L5-L6), conforme técnica descrita por Dewey & Da

Costa (2016). Foi obtido 1 ml de LCE em cada local de colheita e distribuídos em *ependorfs* esterilizado para a quantificação de DNA livre. Antes de realizar a colheita do LCE, foram colhidos 3 ml de sangue para a mensuração do DNA livre no plasma sanguíneo.

Após a colheita de LCE no tempo 0, os cães dos grupos II e III foram submetidos a mielografia, conforme técnica descrita por Dewey & Da Costa (2016). Uma vez definido o local de compressão na medula espinhal, foram submetidos à técnica de hemilaminectomia dorsolateral toracolombar associada à fenestração do disco intervertebral afetado (SHORES, 2017).

Ao término do procedimento cirúrgico, os cães dos GII e GIII receberam compressa de gelo sobre a incisão cirúrgica (durante 15 minutos, a cada quatro horas, por 72 horas), analgesia com cloridrato de morfina ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$, intramuscular, a cada seis horas, durante setenta e duas horas) e terapia anti-inflamatória com maxicam ($0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ no primeiro dia e $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$, uma vez ao dia, durante dois dias, pela via intramuscular). Em todos os cães do GII e GIII, foi realizado exame neurológico aos 15, 30, 60 e 90 dias de PO.

Para o ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA livre, com corante Picogreen, foram utilizados 10 μL do plasma ou LCE, utilizando uma pipeta, em microplacas pretas em, no mínimo, triplicatas. Na sequência, foi adicionado 100 μL do reagente PicoGreen, diluído em 1: 200 em tampão Tris-EDTA, às microplacas para produzir um volume final de 200 μl por poço. Na sequência, as placas foram mantidas em repouso durante 10 minutos, em temperatura ambiente e protegida da luz. Passado o período de incubação, realizou-se uma leitura da placa em fluorescência, com 480 nm de excitação e 520 nm de emissão (COSTA et al., 2017).

O retorno à deambulação foi considerado satisfatório para cães que recuperaram a PDP e a capacidade de andar sem apoio ou sem quedas por 10 passos consecutivos (JEFFERY et al., 2016). A recuperação foi considerada satisfatória sem PDP quando o paciente não recuperou a dor profunda, mas desenvolveu uma marcha espinhal reflexa. O paciente que não recuperou a

capacidade de andar sem apoio e sem quedas, ou quando não houve alteração do estado clínico inicial, a recuperação foi considerada insatisfatória (OLBY et al., 2003).

Para a análise estatística, neste estudo, utilizou programa SPSS versão 21.0. Realizou-se a comparação dos parâmetros objetivos e subjetivos, entre os três grupos, por meio da análise de variância de Kruskal-Wallis, seguido do teste Mann-Whitney, sempre que houvesse diferenças significativas entre os grupos. Dentro de cada grupo, foi utilizada a dupla análise de variância de Friedman para as comparações entre os diversos momentos, seguido do teste de Wilcoxon para a identificação dos momentos diferentes. Os resultados foram considerados significantes quando $p \leq 0.05$.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob o número 8139220217.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Grupo I, foram incluídos cinco cães machos e cinco fêmeas, sendo 80% (8/10) Sem Raça Definida (SRD), 10% (1/10) Shit-Tzu e 10% (1/10) American Staffordshire. A média de idade foi dois anos (2 - 6 anos) e peso médio de 15,7 kg (2 – 28,5 Kg). No grupo II, 80% (8/10) eram fêmeas e 20% (2/10) machos, sendo que 50% (5/10) eram da raça Dachshund, 30% SRD, 10% Yorkshire e 10% Basset Hound. A média de idade foi sete anos (5 – 11 anos) e peso médio de 6,9 kg (4 – 25,4 Kg). No grupo III, 60% (6/10) eram fêmeas e 40% (4/10) machos, 50% (5/10) eram Dachshund, 30% SRD, 10% Yorkshire e 10% Poodle. A média de idade foi 6,5 anos (5 – 8 anos), peso médio 7,9 kg (2,9 – 13,7 Kg). Os locais de compressão medular foram: T10-T11 (GII=0 e GIII=1); T11-T12 (GII=1 e GIII=1); T12-T13 (GII= 4 e GIII=5), T13-L1 (GII=4 e GIII=2); L1-L2 (GII=0 e GIII=1) e L2-L3 (GII=1 e GIII=0). A concentração de DNA livre de acordo com o grupo estudado, tipo de amostra, local de colheita e nos diferentes tempos está representada na Tabela 1.

O nível sérico de DNA livre foi quantificado em humanos após o acidente vascular encefálico. Foi observado um aumento na concentração, que persistiu até o 30º dia após a lesão e uma correlação positiva do nível de DNA livre com a severidade da doença (TSAI et al., 2011). Outro estudo, em humanos, avaliou o nível de DNA livre plásmatico nas primeiras 96 horas após o trauma crânio-encefálico (TCE). Verificaram uma redução de 51% nas primeiras 24 horas e 78% nas 48 horas seguintes após o trauma e consideraram o nível de DNA livre plásmatico como um biomarcador no prognóstico de TCE (MACHER et al., 2012).

Nesse estudo, foi possível observar, no tempo 0, maior concentração de DNA livre no LCE dos cães paraplégicos do GII e GIII em comparação com o GI, demonstrando possível dano celular causado pela lesão na medula espinhal e consequente liberação do DNA (Fig. 1). O DNA livre de células circulantes é liberado como resultado de apoptose e necrose celular (TSAI et al., 2011; MACHER et al., 2012), situação encontrada no trauma agudo da medula espinhal (SHORES, 1992; JEFFERY et al., 2016) ou em outras lesões que afetam o sistema nervoso central (MACHER et al., 2012).

Em cães com lesão na medula espinhal em decorrência da EDIV toracolombar foram avaliados diferentes biomarcadores que pudessem auxiliar na identificação da severidade da lesão e também no retorno à deambulação (LEVINE et al., 2010; SRUGO et al., 2011; ROERIG et al., 2013; WITSBERGER et al., 2012; TAYLOR et al., 2014). Entre os mais promissores, pode-se citar a proteína fibrilar glial ácida (GFAP) que foi mensurada no soro e auxiliou no prognóstico de recuperação à deambulação e no desenvolvimento mielomalácia progressiva (SATO et al., 2013; OLBY et al., 2020).

Nesse estudo, a duração dos sinais neurológicos até a realização da cirurgia foi: até dois dias (GII=3 e GIII=4); entre 3-5 dias (GII=3 e GIII=4); entre 5-15 dias (GII=4 e GIII=1) e acima de 15 dias (GII=0 e GIII=1). Mesmo com variações na duração dos sinais clínicos, não houve mudanças significativas na concentração de DNA livre nos cães dos GII e GIII no momento da

apresentação. Esses achados possivelmente demonstram que a concentração de DNA livre possa estar ligada à intensidade e não à persistência dos eventos secundários destrutivos após injúria na medula espinhal (BAGLEY, 2000; MALLEI et al., 2005; JEFFERY et al., 2016).

As limitações de mensurar biomarcadores no LCE são a complexidade na colheita e a necessidade de anestesia geral (OLBY et al., 2022). Nesse estudo, foram feitas análises pareadas do DNA livre entre o plasma e o LCE no tempo 0 (antes da cirurgia) para comparar as concentrações de DNA livre. Mesmo não havendo diferença significativa, notou-se que o nível de DNA livre nos cães do GI foi maior no plasma, em comparação aos cães do GII e GII, o que não justificaria, por se tratar de animais saudáveis (Fig. 1). Por outro lado, os níveis de DNA livre no LCE foram maiores nos cães do GII e GIII, ou seja, aqueles que estavam paraplégicos. Logo, esse achado sugere que o nível de DNA livre proveniente do LCE possa ser mais sensível em demonstrar a lesão na medula espinhal que os obtidos no plasma.

Quanto ao retorno à deambulação, nos cães do GII, 70% (7/10) foram acompanhados até o 90º dia de PO e 100% tiveram o retorno à deambulação de forma satisfatória, em média, 13 dias (7 – 18 dias) após a cirurgia. Já, nos cães do GIII, em 40% (4/10) o retorno foi satisfatório, 20% (2/10) satisfatório, mas sem recuperar a PDP e 40% (4/10) foi considerado insatisfatório. O tempo médio de retorno à deambulação satisfatória foi de 18 dias (7-30 dias) e para os que não recuperaram a PDP em torno de 52 dias (45-60 dias).

Conforme citado pela literatura, o DNA livre pode ser utilizado para avaliar a severidade de uma doença e o prognóstico, devido a redução nos níveis com a melhora clínica do paciente (RAINER et al., 2003; TSAI et al., 2011; MACHER et al., 2012). Nesse estudo, no entanto, o que se esperava ao correlacionar a concentração de DNA livre dos cães dos GII e GIII com a recuperação (retorno à deambulação) era que o nível fosse estar menor com o decorrer do tempo (Tabela 1). Além disso, aos 90 dias de PO, o nível de DNA aumentou em relação aos tempos 0 e 30 dias de PO. Poucos foram os artigos encontrados na literatura que avaliaram a concentração

de DNA livre por um período longo de tempo. O único encontrado foi o trabalho de Tsai et al. (2011), que avaliaram por até 30 dias em pacientes humanos com acidente vascular encefálico.

Mesmo que 40% dos cães do grupo III não tiveram recuperação satisfatória, o que poderia indicar ainda efeitos secundários de uma lesão severa na medula espinhal e contribuir para o aumento na concentração de DNA livre aos 90 dias, essa hipótese seria rejeitada ao perceber que, no GII aonde todos os cães recuperaram a deambulação, a concentração de DNA livre no LCE também aumentou no mesmo período, ao comparar com os níveis nos dias 0 e 30 de PO. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Foreman et al. (2021) ao verificar que embora a proteína C reativa sérica foi maior nos cães paraplégicos sem PDP, ela se manteve elevada, mesmo em cães que tiveram recuperação à deambulação.

Como limitações nesse estudo, pode-se citar o baixo número de animais utilizados em cada grupo e a impossibilidade de mensurar a concentração de DNA livre nos tempos 30 e 90 dos cães do grupo I (controle) no LCE e no plasma. Pela ausência das análises nesses tempos, impossibilitou uma adequada compreensão do comportamento do DNA livre após um procedimento cirúrgico eletivo em cães hípidos, já que não existem estudos relatando essa situação.

Sendo assim, não foi possível encontrar motivos que ocasionaram o aumento na concentração de DNA livre de cães paraplégicos com EDIV TL, mesmo após o retorno à deambulação. Logo, a concentração de DNA livre pode ser quantificada em cães e indicar uma lesão na medula espinhal, mas não permite ser utilizado como prognóstico no retorno à deambulação após o tratamento cirúrgico. As diversas fontes de liberação do DNA celular (STROUN et al., 2001; ELSHIMALI et al., 2013), variações individuais no nível de DNA livre (RAINER et al., 2003) e a possível persistência dos eventos secundários e da inflamação após o trauma na medula espinhal (SPROSTON & ASHWORTH, 2018) possam ter contribuído na

variação da concentração do DNA livre, mesmo nos cães que tiveram recuperaram a deambulação.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que há variações no nível de DNA livre, de acordo com o tipo de amostra (LCE ou plasma), sendo o LCE mais sensível; é possível quantificar o DNA livre do LCE e do plasma de cães paraplégicos com ou sem PDP ocasionado por EDVI e submetidos ao tratamento cirúrgico, mas não permiti, no pós-operatório, ser utilizado no prognóstico para o retorno à deambulação.

AGRADECIMENTOS

Este artigo teve suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo número 310969/2021-2 e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE

Não há conflitos de interesse para declarar.

REFERÊNCIAS

AIKAWA, T. et al. Long-term neurologic outcome of hemilaminectomy and disk fenestration for treatment of dogs with thoracolumbar intervertebral disk herniation: 831 cases (2000-2007). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.241, n.12, p.1617-1626, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23216037/>>. Acessado em: 05 de julho 2023. doi: 10.2460/javma.241.12.1617.

BAGLEY, R.S. Spinal fracture or luxation. **Veterinary Clinics North America Small Animal Practice**, v.30, n.1, p.133-153, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10680212/>> Acessado em: 05 de junho 2023. doi: 10.1016/s0195-5616(00)50006-0.

BURNETT, D.L. et al. Investigation of cell-free DNA in canine plasma and its relation to disease. **Veterinary Quarterly**, v. 36, n. 3, p.122-129, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27103480/>> Acessado em: 02 de junho 2023. doi: 10.1080/01652176.2016.1182230.

CHAMISHA, Y. et al. The prognostic value of cerebrospinal fluid characteristics in dogs without deep pain perception due to thoracolumbar disc herniation. **Research Veterinary Science**, v.100, p.189-196, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25957960/>> Acessado em: 02 de junho 2023. doi: 10.1080/01652176.2016.1182230.

COSTA, F. et al. Seminal cell-free DNA levels measured by PicoGreen fluorochrome are associated with sperm fertility criteria. **Zygote**, v.25, n.2, p. 111-119, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28264730/>> Acessado em: 02 de junho 2023. doi: 10.1017/S0967199416000307.

DEWEY, C.W.; DA COSTA, R.C. Myelopathies: Disorders of the Spinal Cord. In: DEWEY, C. W.; DA COSTA, R. C. (Eds). **Practical guide to canine and feline neurology**. JohnWiley: Ames, 2016. p.329-404.

ELSHIMALI, Y.I. et al. The clinical utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer patients. **International Journal Molecular Science**, v.14, n.9, p. 18925–18958, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3794814/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.3390/ijms140918925.

FOREMAN, M. et al. Serum C-reactive protein in dogs with paraplegia secondary to acute intervertebral disc extrusion. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v.35, p.1857-1869, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34085305/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1111/jvim.16179.

HA, T.T.N. et al. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. **Plos One**, v.6, n.10, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3189230/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1371/journal.pone.0025969.

HEBLINSKI, N.; SCHMÖKE, H. Our Approach to Intervertebral Disc Disease in Dogs: A Review of the Current Literature. **Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis**, v.7, n.1, p.1-9, 2018. Disponível em: <https://www.scitechnol.com/peer-review/our-approach-to-intervertebral-disc-disease-in-dogs-a-review-of-the-current-literature-Vcyq.php?article_id=7134> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.4172/2325-9590.1000246

JEFFERY, N.D. et al. Factors associated with recovery from paraplegia in dogs with loss of pain perception in the pelvic limbs following intervertebral disk herniation. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.248, n.4, p.386-394, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26829270/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.2460/javma.248.4.386.

JEFFERY, N.D. et al. Intervertebral disk degeneration in dogs: consequences, diagnosis, treatment, and future directions. **Journal Veterinary Internal Medicine**, n.27, p.1318-1333, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24010573/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1111/jvim.12183.

LEVINE, G.J. et al. Cerebrospinal Fluid Myelin Basic Protein as a Prognostic Biomarker in Dogs with Thoracolumbar Intervertebral Disk Herniation. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v.24, p.890–896, 2010. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20492479/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0531.x.

MACHER, H. et al. Role of early cell-free DNA levels decrease as a predictive marker of fatal outcome after severe traumatic brain injury. **Clinica Chemica Acta**, v.414, p. 12-17, 2012. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22902808/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1016/j.cca.2012.08.001.

MALLEI, A. et al. The nitrosteroid NCX 1015, a prednisolone derivative, improves recovery of function in rats after spinal cord injury. **Brain Research**, v.1062, p.16-25, 2005. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16263098/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1016/j.brainres.2005.08.057.

NISHIDA, H. et al. Evaluation of Serum Phosphorylated Neurofilament Subunit NF-H as a Prognostic Biomarker in Dogs With Thoracolumbar Intervertebral Disc Herniation. **Veterinary Surgery**, v.43, n.3, 289–293, 2014. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24467275/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1111/j.1532-950X.2014.12144.x.

OLBY, J. N. et al. Chronic and acute compressive spinal cord lesions in dogs due to intervertebral disc herniation are associated with elevation in lumbar cerebrospinal fluid glutamate concentration. **Journal of Neurotrauma**, v.16, p.1215-1224, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10619199/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1089/neu.1999.16.1215.

OLBY, N. et al. Long-term functional outcome of dogs with severe injuries of the thoracolumbar spinal cord: 87 cases (1996-2001). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 6, p. 762-769, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12675299/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.2460/javma.2003.222.762.

OLBY, N. J The pathogenesis and treatment of acute spinal cord injuries in dogs. **Veterinary Clinics North America Small Animal Practice**, v.40, n.5, p.791-807, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20732592/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.05.007.

OLBY, N.J. et al. Prognostic Factors in Canine Acute Intervertebral Disc Disease. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 26, n.7, p. 596059, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33324703/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.3389/fvets.2020.596059.

OLBY, N.J. ACVIM consensus statement on diagnosis and management of acute canine thoracolumbar intervertebral disc extrusion. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v.35, n.5. p.1570-1596, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35880267/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1111/jvim.16480.

RAINER, T.H. et al. Prognostic Use of Circulating Plasma Nucleic Acid Concentrations in Patients with Acute Stroke. **Clinical Chemistry**, v. 49, n.4, p. 562-569, 2003. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12651807/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1373/49.4.562.

RIPPLINGER, A. et al. Functional outcome in dogs undergoing hemilaminectomy for thoracolumbar disc extrusion but without nociception > 96 h: A prospective study. **The Veterinary Journal**, v.292, p.105951, 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36646271/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1016/j.tvjl.2023.105951.

ROERIG, A. CARLSON, R.; TIPOLD, A.; STEIN, V.M. Cerebrospinal fluid tau protein as a biomarker for severity of spinal cord injury in dogs with intervertebral disc herniation. **The Veterinary Journal**, v. 197, p.253- 258, 2013. Disponível em: <

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23499240/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.02.005.

SATO, Y. et al. Serum Glial Fibrillary Acidic Protein as a Diagnostic Biomarker in Dogs with Progressive Myelomalacia. **Journal Veterinary Medicine Science**, v.75, n.7, p.949-953, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23470323/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1292/jvms.12-0483.

SHORES, A. Spinal trauma pathophysiology and management of traumatic spinal injuries. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v.22, n.4, p. 859-888, 1992. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1641921/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1016/s0195-5616(92)50080-8.

SHORES, A. Thoracolumbar hemilaminectomy. In: SHORES, A.; BRISSON, B.A. **Current Techniques in Canine and Feline Neurosurgery**. New Jersey: WileyBlackwell, 2017. Cap.20, p.179-182.

SPRINTON, N.R., ASHWORTH, J.J. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. **Frontiers in Immunology**, n.9, p.754, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5908901/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.3389/fimmu.2018.00754.

SRUGO, I. et al. Association of cerebrospinal fluid analysis findings with clinical signs and outcome in acute nonambulatory thoracolumbar disc disease in dogs. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v.25, p.846-855, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21689153/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.0739.x.

STROUN, M. et al. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. **Clinica Chimica Acta**, v.313, p. 139-142, 2001. Disponível em: <

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11694251/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1016/s0009-8981(01)00665-9.

TAYLOR, A.R. et al. Cerebrospinal Fluid Inflammatory Cytokines and Chemokines in Naturally Occurring Canine Spinal Cord Injury. **Journal of Neurotrauma**, v.31, p. 1561-1569, 2014. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24786364/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1089/neu.2014.3405.

TSAI, N. et al. The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients with acute ischemic stroke. **Clinica Chimica Acta**, v.412, p.476-479, 2011. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21130757/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.1016/j.cca.2010.11.036.

WITSBERGER, T.H. et al. Associations between cerebrospinal fluid biomarkers and long-term neurologic outcome in dogs with acute intervertebral disk herniation. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.240, n.5, p.555-562, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22332624/>> Acessado em: 08 de junho 2023. doi: 10.2460/javma.240.5.555.

Tabela 1. Concentração de DNA livre (média) no plasma e no líquido cerebrospinal (LCE) nos tempos 0 (antes da cirurgia), 30 e 90 dias de pós-operatório de cães paraplégicos em decorrência da extrusão do disco intervertebral com ou sem a presença de PDP e submetidos à hemilaminetomia toracolombar.

Grupo	Plasma			LCE (CM)			LCE (CL)		
	0	30d	90d	0	30d	90d	0	30d	90d
I	1.032.896	-----	-----	607.824	-----	-----	406.225	-----	-----
II	820.457	867.271	1.322.185	762.158	776.371	997.070	665.704	756.875	1.570.494
III	759.364	1.020.819	1.010.638	789.007	745.317	1.028.033	803.200	812.182	1.213.09

CM: Cisterna magna; CL: cisterna lombar; GI: cães hígdos (controle); GII: cães paraplégicos com dor profunda;

GIII: cães paraplégicos sem dor profunda.

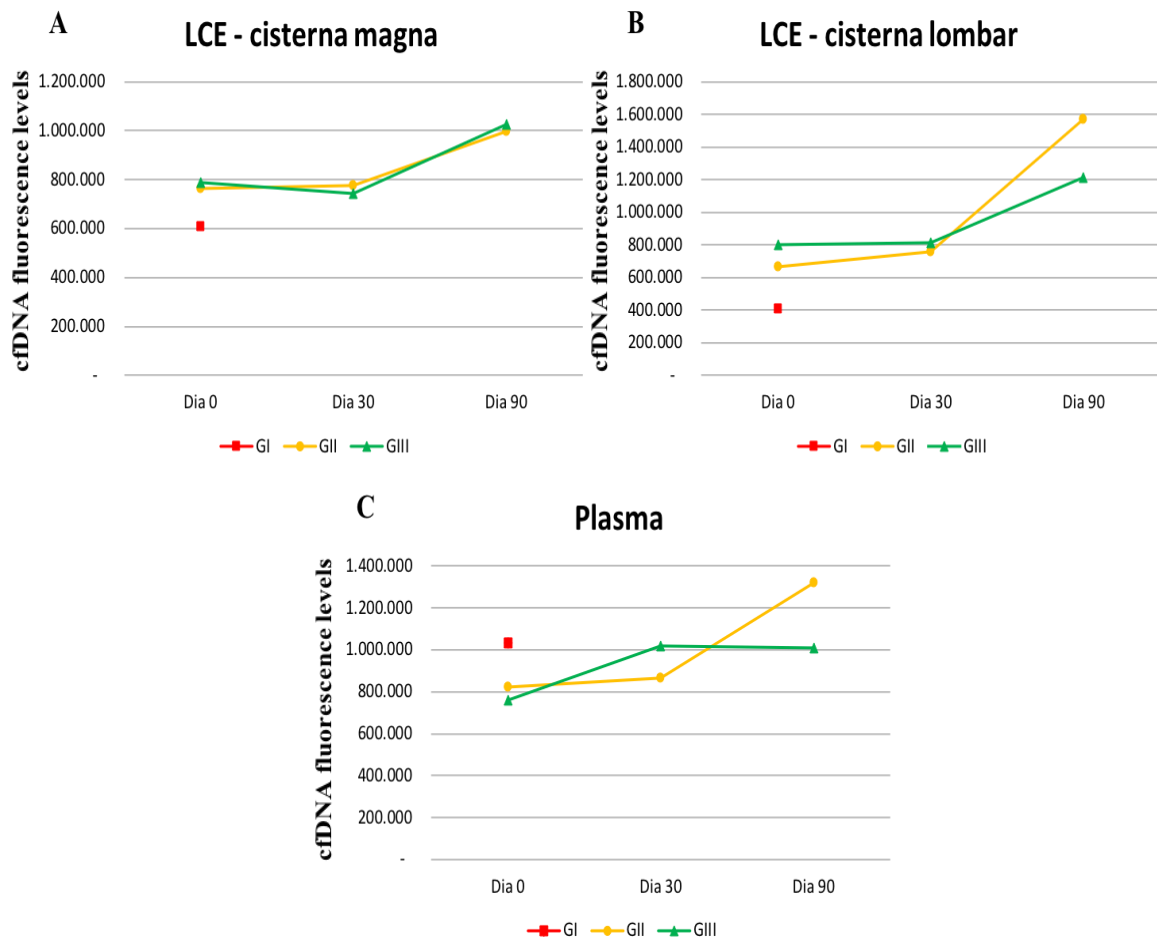


Figura 1. Concentração de DNA livre de acordo com o grupo e tipo de amostra nos tempos 0 (antes da cirurgia), 30 e 90 dias de pós-operatório de cães paraplégicos em decorrência da extrusão do disco intervertebral com ou sem a presença de PDP e submetidos à hemilaminetomia toracolombar. GI: cães hígidos (controle); GII: cães paraplégicos com dor profunda; GIII: cães paraplégicos sem dor profunda.

4. DISCUSSÃO

Os adenomas de sacos anais são raros na Medicina Veterinária, porém os adenocarcinomas correspondem a 2% de todas as neoplasias cutâneas e 17% das neoplasias perianais caninas (BERROCAL et al., 1989). Um levantamento sobre raças de cães britânicos com adenocarcinoma do saco anal sugere que os Spaniels, em particular os Cocker Spaniels ingleses, estão em maior risco (POLTON et al., 2006). A média a idade dos cães diagnosticados com esta doença é de 9 a 11 anos (BENNETT et al., 2002).

O adenocarcinoma do saco anal é uma neoplasia maligna localmente invasiva e altamente metastática. Estudos demonstraram que seu potencial metastático gira em torno de 50% (intervalo de 46% a 96%) no momento da apresentação inicial (POLTON et al., 2007). Os gânglios linfáticos sublobares regionais e os gânglios pélvicos são os locais mais comuns de metástase no início do curso da doença (BENNETT et al., 2002). As metástases ocorrem por via linfática para os linfonodos sublobares, sacrais e ilíacos, em decorrência da elevada vascularização linfática presente na mucosa dos sacos anais (EMMS, 2005). No relato descrito no artigo 1 observou-se metástases em órgão abdominais e torácicos, além das vértebras, medula espinhal e cauda equina, que ocasionou alterações neurológicas severas no paciente, enfatizando a relevância do presente relato.

Para o diagnóstico conclusivo das neoplasias perianais é necessária avaliação histopatológica e imuno-histoquímica (GIULIANO et al., 2017). Macroscopicamente, os carcinomas perianais podem se apresentar como pequenos nódulos, de crescimento lento, indolores e com tempo de evolução de meses a anos. Esses nódulos podem ser isolados, múltiplos ou difusos e não aderidos às estruturas adjacentes (GINN et al., 2007).

As características histológicas das amostras do relato do artigo 1 foram de alta atividade mitótica e população celular organizada formando lóbulos, sendo a suspeita inicial uma neoplasia de origem hepatoide. Ao serem enviadas, no entanto, amostras para análise imuno-histoquímica, constatou-se um adenocarcinoma de saco anal, demonstrando assim, a importância da complementação da imuno-histoquímica ao exame histopatológico para o diagnóstico definitivo.

A existência de DNA circulante livre de células (cfDNA) foi relatada pela primeira vez ao demonstrarem a presença de ácidos nucléicos livres no plasma

sanguíneo de pessoas saudáveis (MANDEL; MÉTAIS, 1948). Esse DNA flutuante livre está presente no componente livre de células de sangue total, como plasma e soro e nos demais fluidos corporais (JAHR et al., 2001).

A hipótese mais comum sobre a circulação do cfDNA no plasma de indivíduos saudáveis acredita que o cfDNA pode derivar principalmente da apoptose de células normais da linhagem hematopoiética (LUI et al., 2002) ou de outras células nucleadas (SWARUP; RAJESWARI, 2007) que, em circunstâncias fisiológicas, são eliminados pela infiltração de fagócitos, com níveis de cfDNA relativamente baixos em indivíduos saudáveis (DIAZ; BARDELLI, 2014).

Até o momento, apoptose e necrose não são os únicos mecanismos responsável pela presença de cfDNA circulante. Acredita-se que linfócitos e outros tipos de células vivas podem liberar DNA recém-sintetizado (STROUN et al., 2001b; VAN DER VAART et al., 2008) isso pode indicar um papel do cfDNA no funcionamento normal das células ou seu envolvimento em um tipo de intercomunicação ativa entre as células via liberação de ácidos nucleicos como uma via de sinalização intercelular (GARDINER, 2015).

Na tentativa de diferenciar as respostas quantos à recuperação funcional de cães paraplégicos sem percepção da dor profunda, tem-se investigado biomarcadores no plasma e no líquido cerebroespinal (OLBY et al., 2020). Diante disso, diferentes estudos foram realizados com diferentes biomarcadores, entre eles a proteína C reativa sérica (FOREMAN et al., 2021), neurofilamento de alto peso molecular (pNF-H) (NISHIDA et al., 2014), proteína TAU no líquido cerebroespinal (LCE) (ROERIG et al., 2013), proteína básica mielina, glicose, cálcio, lactato (WITSBERGER et al., 2012), GFAP, pNF-H e S100 β (OLBY et al., 2019), proteína básica de mielina no LCE (MBP) (LEVINE et al., 2010).

Devido os resultados em alguns estudos com biomarcadores serem conflitantes, busca-se ainda um biomarcador que não tenha influência da duração da lesão, com capacidade de mensurá-los no momento da apresentação, além de estabelecer prognóstico significativo para o tutor. Com base nisso, até o presente momento não há um teste rápido disponível que atingiu esse ponto de utilidade clínica (OLBY et al., 2020).

Com o intuito de criar uma alternativa no prognóstico quanto ao retorno à deambulação de cães paraplégicos sem dor profunda, foi investigada a concentração do DNA livre no LCE e no plasma no pós-operatório descrito no artigo 2. O que se

esperava ao correlacionar a concentração de DNA livre dos cães paraplégicos com ou sem dor profunda com a recuperação (retorno à deambulação) era que o nível fosse estar menor com o decorrer do tempo, situação não observada. Além disso, aos 90 dias de PO, o nível de DNA aumentou em relação aos tempos 0 e 30 dias de PO.

Embora a concentração de DNA livre é considerado um biomarcador nas doenças neoplásicas (ULRICH; PAWELETZ, 2018), vascular isquêmica (TSAI et al., 2011) e no trauma crânio-encefálico (MACHER et al., 2012), o estudo descrito no artigo 2 conseguiu demonstrar que a concentração de DNA livre pode ser quantificada em cães paraplégicos com ou sem dor profunda em decorrência de extrusão de disco intervertebral, indicar uma lesão na medula espinhal, mas não permite ser utilizado como biomarcador no prognóstico de retorno à deambulação após o tratamento cirúrgico.

5. CONCLUSÃO

Os cães com metástase de carcinoma do saco anal para a coluna vertebral e tecidos nervosos apresentam prognóstico desfavoráveis e deve ser incluído no diagnóstico diferencial de cães que apresentam sinais neurológicos compatíveis com mielopatia e histórico prévio de tumor na região perianal. É necessária a realização da imuno-histoquímica na complementação dos achados histopatológicos para confirmação desse tipo de neoplasia.

É possível quantificar o DNA livre no LCE e no plasma, mas a concentração no pós-operatório não deve ser utilizada como biomarcador no prognóstico para o retorno à deambulação de cães paraplégicos com ou sem percepção à dor profunda, ocasionado por extrusão de disco intervertebral após o tratamento cirúrgico.

6. REFERÊNCIAS

ABRAMSON, Carley. J. *et al.* Magnetic resonance imaging appearance of suspected ischemic myelopathy in dogs. **Veterinary Radiology & Ultra-sound**, v. 46, n. 3, p. 225-229, may. 2005. DOI: 10.1111/j.1740-8261.2005.00037.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16050280/>. Acesso em: 20 jun. 2023.

AHN, Soomin *et al.* Comparison of clinical and inflammatory parameters in dogs with pyometra before and after ovariohysterectomy. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 85, n. 4, p. 271-278, oct. 2021. PMID: 34602731. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34602731/>. Acesso em: 6 jun. 2023.

ALIX-PANABIERES, Catherine; PANTEL, Klaus. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. **Cancer Discovery**, v. 6, n.5, p. 479-491, may. 2016. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-1483. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26969689/>. Acesso em: 3 jun. 2023.

BAGLEY, Rodney S. Spinal fracture or luxation. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.30, n.1, p.133-153, jan. 2000. DOI: 10.1016/S0195-5616(00)50006-0. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195561600500060>. Acesso em 11 de jun. 2023.

BEFFAGNA, Giorgia *et al.* Circulating cell-free DNA in dogs with mammary tumors: short and long fragments and integrity index. **Plos One Collection Soil Sciences**, v. 12, n. 1, p. e0169454, jan. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0169454. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0169454>. Acesso em: 5 jun. 2023.

BENNETT, Peter *et al.* Canine anal sac adenocarcinomas: clinical presentation and response to therapy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 1, p. 100-104, fev. 2002. DOI: 10.1892/0891-6640(2002)016<0100:casacp>2.3.co;2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11822797/>. Acesso em: 1 jul. 2023.

BERGKNUT, Niklas *et al.* Intervertebral disc degeneration in the dog. Part 1: anatomy and physiology of the intervertebral disc and characteristics of intervertebral disc degeneration. **The Veterinary Journal**, v.195, n. 3, p.282-291, mar 2013. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.10.024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23177522/>. Acesso em: 12 jun. 2023.

BERROCAL, A. *et al.* Quorum sensing activity in *Ophiostoma ulmi*: effects of fusel oils and branched chain amino acids on yeast-mycelial dimorphism. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 126–134, jul. 2012. DOI:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05317.x>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/113/1/126/6715470?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 1 jul. 2023.

BOS, Alexanra Squires *et al.* Accuracy, intermethod agreement, and inter-reviewer agreement for use of magnetic resonance imaging and myelography in small-breed dogs with naturally occurring first-time intervertebral disk extrusion. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 240, n. 8, p. 969-977, apr. 2012. DOI: 10.2460/javma.240.8.969. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22471826/>. Acesso em: 13 de jun. 2023.

BOTEZATU, I. *et al.* Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1078-1084, aug. 2000. PMID: 10926886. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10926886/#full-view-affiliation-1>. Acesso em: 3 jun. 2023.

BRISSON, Brigitte A. Intervertebral disc disease in dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, n. 5, p. 829-858, sep. 2010. DOI: 10.1016/j.cvsm.2010.06.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20732594/>. Acesso em: 12 de jun. 2023.

CASADIO, Valentina *et al.* Urine cell-free DNA integrity as a marker for early prostate cancer diagnosis: a pilot study. **Biomed Research International**, v. 2013, e270457, feb. 2013. DOI: 10.1155/2013/270457. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3586456/>. Acesso em: 3 jun. 2023.

CHAN, Allen K. *et al.* Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: a new tool in molecular diagnosis. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 122-130, mar. 2003. DOI: 1258/000456303763046030. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12662399/>. Acesso em: 2 jun. 2023.

CHANG, Cristina P. *et al.* Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. **Clinical Chimica Acta**, v. 327, n. 1, p. 95-101. DOI: 10.1016/s0009-8981(02)00337-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12482623/>. Acesso em: 2 jun. 2023.

CHENG, Feifei; SU, Li; QIAN, Cheng. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 30, p. 48832-48841, jul. 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.9453. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27223063/>. Acesso em 3 jun. 2023.

CHERRONE, Karen L. *et al.* A retrospective comparison of cervical intervertebral disk disease in nonchondrodystrophic large dogs versus small dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, n. 3, p. 316-320, aug. 2004. DOI: 10.5326/0400316. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15238562/>. Acesso em: 4 jul. 2023.

CHIERICHETTI, A. L.; ALVARENGA, J. de. Afecção degenerativa do disco intervertebral tóraco-lombar: revisão. **Revista Clínica veterinária**, São Paulo, n. 22, 1999.

DA COSTA, Ronaldo Costa da; MOORE, Sarah A. Differential diagnosis of spinal diseases. **Veterinary Clinics of the Small Animal**, v. 40, n. 5, p. 755-763, sep 2010. DOI: 10.1016/j.cvsm.2010.06.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20732590/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

DA COSTA, Ronaldo Costa da; SAMII, Valerie F. Advanced imaging of the spine in small animals. **Veterinary Clinics of the Small Animal**, v. 40, n. 5, p. 765–790, sep 2010. DOI: 10.1016/j.cvsm.2010.05.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20732591/>. Acesso em: 3 jul. 2023.

DA COSTA, Ronaldo C. *et al.* Diagnostic Imaging in Intervertebral Disc Disease. **Frontiers Veterinary Science**, v. 22, n. 7, e588338, out. 2020. DOI: 10.3389/fvets.2020.588338. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33195623/>. Acesso em: 1 jul. 2023.

DELAMARTER, R. B; SHERMAN, J. CARR, J. B. Pathophysiology of spinal cord injury. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.77, n. 7, p.1042-1049, jul. 1995. DOI: 10.2106/00004623-199507000-00010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7608226/>. Acesso em: 3 jul. 2023.

DEWEY, Curtis W.; DA COSTA, Ronaldo C. Myelopathies: Disorders of the Spinal Cord. *In*: DEWEY, Curtis. W.; DA COSTA, R. C. **Practical guide to canine and feline neurology**. 3. Ed. New Jersey: Wiley Blackwell, 2016. p.329-404.

DIAZ, Luis Junior *et al.* The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. **Nature**, v. 486, n. 7404, p. 537-540, jun. 2012. DOI: 10.1038/nature11219. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22722843/>. Acesso em: 3 jun. 2023.

DIAZ, Luis Junior; BARDELLI, Alberto. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 6, p. 579-586, feb. 2014. DOI: 10.1200/JCO.2012.45.2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24449238/>. Acesso em: 1 jul. 2023.

DIEHL, Frank *et al.* Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. **Nature Medicine**, v. 14, n. 9, p. 985-990, sep. 2008. DOI: doi: 10.1038/nm.1789. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18670422/>. Acesso em: 3 jun. 2023.

DOMÍNGUEZ-VIGIL, Irma G. *et al.* The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 2, p. 2912-2922, dec. 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.23131. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29416824/>. Acesso em: 4 jun. 2023.

DRAGAN, A.I. *et al.* Metal-enhanced PicoGreen fluorescence: application for double-stranded DNA quantification. **Analytical Biochemistry**, v. 396, n. 1, p. 8-12, jan. 2010a. DOI: 10.1016/j.ab.2009.09.010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19748479/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

DRAGAN, A.I. et al. Metal-enhanced PicoGreen fluorescence: Application to fast and ultra-sensitive pg/ml DNA quantitation. **Journal of Immunological Methods**, v. 362, n. 1, p. 95–100, oct. 2010b. DOI: 10.1016/j.jim.2010.09.011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20833180/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

EMMS, S. G. Anal sac tumours of the dog and their response to cytoreductive surgery and chemotherapy. **Australian Veterinary Journal**, v. 83, n. 6, p. 340-343, jun. 2005. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2005.tb15626.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15986909/>. Acesso em: 1 jul. 2023.

ESPLIN DG, WILSON SR, HULLINGER GA: Squamous cell carcinoma of the anal sac in five dogs, **Veterinary Pathology**, v.40, n.3, p. 332–334, 2003. DOI: 10.1354/vp.40-3-332 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12724576/>. Acesso em: 1 jul. 2023

FENN, Joe; OLBY, Natasha. Classification of Intervertebral Disc Disease. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. 7, e579025, oct. 2020. DOI: 10.3389/fvets.2020.579025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33134360/>. Acesso em: 1 jul. 2023.

FOREMAN, Max *et al.* Serum C-reactive protein in dogs with paraplegia secondary to acute intervertebral disc extrusion. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 35, n. 4, p.1857-1869, jul 2021. DOI: 10.1111/jvim.16179. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8295702/>. Acesso em: 6 jun. 2023.

FRANK, Mayo O. Circulating Cell-Free DNA Differentiates Severity of Inflammation. **Biological Research for Nursing**, v. 18, n. 5, p. 477-488, oct. 2016. DOI: 10.1177/1099800416642571. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27067611/>. Acesso em: 2 jun. 2023.

GAMA, Fernanda Velasque *et al.* Caracteres físicos-químicos e citológicos do líquido de cães em diferentes fases da cinomose. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 596-601, jun. 2005. DOI: 10.1590/S0103-84782005000300016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/XyLW99zYDMMbZc5qq3JzqCH/?lang=pt>, Acesso em: 2 jul. 2023.

GARZÓN, Mónica *et al.* KRAS mutations in the circulating free DNA (cfDNA) of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. **Translational Lung Cancer Research**, v. 5, n.5, p. 511-516, oct. 2016. DOI: 10.21037/tlcr.2016.10.14. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5099515/>. Acesso em: 3 jun. 2023.

GARDINER, Chris *et al.* Extracellular vesicles, tissue factor, cancer and thrombosis - discussion themes of the ISEV 2014 Educational Day. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 13, n. 4, e26901, mar. 2015. DOI: 10.3402/jev.v4.26901. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4359985/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

GEORGIU, Christos D.; PAPAPOSTOULOU, Ioannis; GRINTZALIS, Konstantinos. Protocol for the quantitative assessment of DNA concentration and damage (fragmentation and nicks). **Nature Protocols**, v. 4, p.125-131, jan. 2009. DOI: 10.1038/nprot.2008.222. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2008.222#citeas>. Acesso em: 2 jul. 2023.

GIACONA, Mary Beth *et al.* Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. **Pancreas**, v. 17, n. 1, p. 89-97, jul. 1998. DOI: 10.1097/00006676-199807000-00012. Disponível em: https://journals.lww.com/pancreasjournal/Abstract/1998/07000/Cell_Free_DNA_in_Human_Blood_Plasma__Length.12.aspx. Acesso em: 1 jul. 2023.

GINN P.E., MANSELL J.E.K.L. & RAKICH P.M. 2007. Skin and appendages. In: Caswell, J. & Williams K. (Eds). **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. Toronto: Elsevier Saunders, pp.553-781.

GIULIANO A., DOBSON J. & MASON S. Complete resolution of a recurrent canine anal sac squamous cell carcinoma with palliative radiotherapy and carboplatin chemotherapy. **Veterinary Science**. V.4, n.3, p.45, 2017. DOI: 10.3390/vetsci4030045. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5644661>. Acesso em: 3 jul. 2023.

GRANGER, Nicolas; CARWARDINE, Darren. Acute spinal cord injury tetraplegia and paraplegia in small animals. **Veterinary clinics of the small animal**, v. 44, n. 6, p.1131– 1156, nov. 2014. DOI: 10.1016/j.cvsm.2014.07.013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25441629/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

HA, Tran Thi Ngoc *et al.* Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. **PLOS ONE**, v.6, n.10, oct. 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0025969. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0025969>. Acesso em 2 jul. 2023.

HANSEN, Tove *et al.* The Myth of Fibroid Degeneration in the Canine Intervertebral Disc: A Histopathological Comparison of Intervertebral Disc Degeneration in Chondrodystrophic and Nonchondrodystrophic Dogs. **Veterinary Pathology**, v.54, n.6, p.945-952, 2017. DOI: 10.1177/0300985817726834. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28847244/>. Acesso em: 4 jun. 2023.

HEITZER, Ellen; ULZ, Peter; GEIGL, Jochen B. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 112-123, jan. 2015. DOI: 10.1373/clinchem.2014.222679. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25388429/>. Acesso em: 4 jun. 2023.

HO, M. W. Intercommunication via circulating nucleic acids. **Science in Society Archive**, v. 42, p. 46-48, 2009. Disponível em: <https://www.i-sis.org.uk/circulatingNucleicAcids.php>

HOERLEIN, B. F. The status of the various intervertebral disc surgeries for the dog in 1978. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.14, p.260-269, 1978.

HOLDHOFF, Matthias *et al.* Analysis of circulating tumor DNA to confirm somatic KRAS mutations. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 18, p. 1284-1285, sep. 2009. DOI: 10.1093/jnci/djp240.

ITOH, Hisanora *et al.* A retrospective study of intervertebral disc herniation in dogs in Japan: 297 cases. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 7, p. 701-706, jul. 2008. DOI: 10.1292/jvms.70.701. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18685242/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

JANSSENS, L. A. A. Mechanical and pathophysiological aspects of acute spinal cord trauma. **Journal of Small Animal Practice**, v. 32, n. 11, p. 527-579, apr. 1991. DOI: 10.1111/j.1748-5827.1991.tb00889.x. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/229722693_Mechanical_and_pathophysiological_aspects_of_acute_spinal_cord_trauma. Acesso em: 2 jul. 2023.

JAHR, S. *et al.* DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. **Cancer Research**, v. 61, n. 4, p. 1659-1665, feb. 2001. PMID: 11245480. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11245480/>. Acesso em: 1 jul. 2023.

JEFFERY, N. D. Medical and conservative therapy. In:____. **Handbook of small animal spinal surgery**. London: Saunders, 1995. Cap.15, p.215-221.

JEFFERY, N. D. *et al.* Intervertebral disk degeneration in dogs: consequences, diagnosis, treatment, and future directions. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 6, p.1318-1333, nov. 2013. DOI: 10.1111/jvim.12183. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24010573/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

JEFFERY, U. *et al.* Cell-Free DNA and DNase Activity in Dogs with Immune-Mediated Hemolytic Anemia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 5, p. 1441-1450, sep. 2017. DOI: 10.1111/jvim.14808. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28833583/>. Acesso em: 6 jun. 2023.

JING, Debra *et al.* A sensitive two-color electrophoretic mobility shift assay for detecting both nucleic acids and protein in gels. **Proteomics**, v. 3, n. 7, p.1172, jul. 2003. DOI: 10.1002/pmic.200300438. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12872218/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

KAZAKOS, G. et al. Duration and severity of clinical signs as prognostic indicators in 30 dogs with thoracolumbar disk disease after surgical decompression. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, n. 3, p.147-152, apr. 2005. DOI: 10.1111/j.1439-0442.2005.00698.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0442.2005.00698.x>. Acesso em: 2 jul. 2023.

KARACHALIOU, Niki *et al.* Possible application of circulating free tumor DNA in non-small cell lung cancer patients. *Journal of Thoracic Disease*, v. 9, n.13, p.1364-1372, oct. 2017. DOI: 10.21037/jtd.2017.09.59. Disponível em: <https://jtd.amegroups.com/article/view/16431/13194>. Acesso em: 3 jun. 2023.

KIM, Jihu *et al.* Cell-Free DNA as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Dogs With Tumors. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 16, n. 8, e735682, sep. 2021. DOI: 10.3389/fvets.2021.735682. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34604371/>. Acesso em: 4 jun. 2023.

KRANENBURG, Hendrik Jan *et al.* Intervertebral disc disease in dogs - part 2: comparison of clinical, magnetic resonance imaging, and histological findings in 74 surgically treated dogs. **Veterinary Journal**, v. 195, n. 2, p. 164-71, jul. 2012. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.06.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22795604/>. Acesso em: 1 jul. 2023.

LECOUTEUR, A.; CHILD, G. Afecções da medula espinal. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. v. 1, 4. ed. São Paulo: Manole, 1997, cap 83, p. 892-977.

LEON, S.A. *et al.* DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. **Cancer Research**, v. 37, n. 3. P. 645-650, mar. 1977. PMID: 837366. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/837366/>. Acesso em: 3 jun. 2023.

LEVINE, G. J. *et al.* Cerebrospinal Fluid Myelin Basic Protein as a Prognostic Biomarker in Dogs with Thoracolumbar Intervertebral Disk Herniation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 4, p. 890–896, aug. 2010. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2010.0531.x. Acesso em: 7 jun. 2023.

LEWIS, Alexandra R.; VALLE, Juan W.; MCNAMARA, Mairead G. Pancreatic cancer: Are "liquid biopsies" ready for prime-time?. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 32, p. 7175-7185, aug. 2016. DOI: 10.3748/wjg.v22.i32.7175. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4997639/>. Acesso em: 4 jun. 2023.

LEWIS, Melissa J. *et al.* Ambulation in dogs with absent pain perception after acute thoracolumbar spinal cord injury. **Frontiers Veterinary Science**, v. 26, n. 7, p. 560, aug. 2020. DOI: 10.3389/fvets.2020.00560. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7479830/>. Acesso em: 1 jul. 2023.

LI, Jian *et al.* Cell-free DNA copy number variations in plasma from colorectal cancer patients. **Molecular Oncology**, v. 11, n. 8, p. 1099-1111, aug. 2017. DOI: 10.1002/1878-0261.12077. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28504856/>. Acesso em 3 jun. 2023.

LIN, Selena *et al.* Emerging Utility of Urinary Cell-free Nucleic Acid Biomarkers for Prostate, Bladder, and Renal Cancers. **European Urology Focus**, v. 3, n. 2, p. 265-272, apr. 2017. DOI: 10.1016/j.euf.2017.03.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28753876/>. Acesso em: 3 jun. 2023.

LO, Y.M. *et al.* Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. **American Journal of Human Genetics**, v. 64, n. 1, p. 218-224, jan. 1999. DOI: 10.1086/302205. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9915961/>. Acesso em: 1 jun. 2023.

LO, Y. M. *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. **The Lancet**, v. 350, n. 9076, p. 485-487, aug. 1997. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)02174-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9274585/>. Acesso em: 1 jun. 2023.

LORENZ, M. D.; COATES, J. R.; KENT, M. **Handbook of veterinary neurology**. 5 ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2011, p.

LUBBE, A. M.; KIRBERGER, R. M.; VERSTRAETE, F. J. M. Pediculectomy for thoracolumbar spinal decompression in the Dachshund. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.30, p.233, 1994.

LUI, Yani L. Y. *et al.* Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 421-427, mar. 2002. PMID: 11861434. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11861434/>. Acesso em: 1 jul. 2023.

MACHER, Hada *et al.* Role of early cell-free DNA levels decrease as a predictive marker of fatal outcome after severe traumatic brain injury. **Clinica Chimica Acta**, v. 414, p. 12-17, dec. 2012. DOI: 10.1016/j.cca.2012.08.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22902808/>. Acesso em: 5 jun. 2023.

MALLEI, Alessandra *et al.* The nitrosteroid NCX 1015, a prednisolone derivative, improves recovery of function in rats after spinal cord injury. **Brain Research**, v. 1062, p.16-25, aug. 2005. DOI: 10.1016/j.brainres.2005.08.057. Disponível em: https://www.academia.edu/25797736/The_nitrosteroid_NCX_1015_a_prednisolone_derivative_improves_recovery_of_function_in_rats_after_spinal_cord_injury. Acesso em: 2 jul. 2023.

MANDEL, P.; MÉTAIS P. Nuclear acids in human blood plasma. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales**, v. 142, n. 3, p. 41-243, feb. 1948. PMID: 18875018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18875018/>. Acesso em: 1 jul. 2023.

MATTOS-ARRUDA, Leticia; CALDAS, Carlos. Cell-free circulating tumour DNA as a liquid biopsy in breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 10, n. 3, p. 464-474, mar. 2016. DOI: 10.1016/j.molonc.2015.12.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26776681/>. Acesso em: 3 jun. 2023.

MC CARTNEY, W. Comparison of recovery times and complications rates between a modified slanted slot and the standart ventral slot for the treatment of cervical disc disease in 20 dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v.48, n. 9, p. 498-501, sep. 2007. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2006.00309.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17543018/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

MCKEE, W. M. A comparison of hemilaminectomy (with concomitant disc fenestration) and dorsal laminectomy for the treatment of thoraco-lumbar disc protrusion in dogs. **Veterinary Record**, v.130, n. 14, p.296-300, apr. 1992. DOI: 10.1136/vr.130.14.296. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/1595147>. Acesso em: 2 jul. 2023.

MOORE, Sara A. *et al.* Current Approaches to the Management of Acute Thoracolumbar Disc Extrusion in Dogs. **Frontiers Veterinary Science**, v. 3, n. 7, p. 610, sep. 2020. DOI: 10.3389/fvets.2020.00610. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33117847/>. Acesso em: 1 jul. 2023.

MOHAMADZAHERI, Mona *et al.* Relationship between plasma cell-free DNA changes and lysyl oxidase during the treatment and prognosis of canine transmissible venereal tumors. **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 1, p. 76, feb. 2022. DOI: 10.1186/s12917-022-03173-z. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35189882/>. Acesso em 5 jun. 2023.

MURTAZA, Muhammed *et al.* Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. **Nature**, v. 497, n. 7447, p. 108-112, may. 2013. DOI: 10.1038/nature12065. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23563269/>. Acesso em: 3 jun. 2023.

NAGATA, S. *et al.* Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, v. 10, n. 1, p. 108-116, mar. 2003. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401161. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/4401161>. Acesso em: 2 jul. 2023.

NEWCOMB, Brent. *et al.* Comparison of computed tomography and myelography to a reference standard of computed tomographic myelography for evaluation of dogs with intervertebral disc disease. **Veterinary Surgery**, v. 41, n. 2, p. 207–214, feb. 2012. DOI: 10.1111/j.1532-950X.2011.00911.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22091972/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

NIELSEN S.W.; AFTOSMIS J. Canine perianal gland tumours. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 144, n. 1, p. 127-135, jan. 1964. PMID: 14118013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14118013>. Acesso em: 01 jun. 2023.

NIKANJAM, Mina; KATO, Shumei; KURZROCK, Razelle. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *Journal of Hematology & Oncology*, v. 15, n. 131, p. 1-14, sep. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01351-y>. Disponível em: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-022-01351-y>. Acesso em: 3 jun. 2023.

NISHIDA, Hidetaka *et al.* Evaluation of Serum Phosphorylated Neurofilament Subunit NF-H as a Prognostic Biomarker in Dogs With Thoracolumbar Intervertebral Disc Herniation. **Veterinary Surgery**, v. 43, n. 3, p. 289–293, jan. 2014. DOI: 10.1111/j.1532-950X.2014.12144.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1532-950X.2014.12144.x>. Acesso em: 6 jun. 2023.

OLBY, Natasha *et al.* Chronic and acute compressive spinal cord lesions in dogs due to intervertebral disc herniation are associated with elevation in lumbar cerebrospinal fluid glutamate concentration. **Journal of Neurotrauma**, v.16, n. 12, p.1215-1224, dec. 1999. DOI: 10.1089/neu.1999.16.1215. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10619199/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

OLBY, Natasha *et al.* Long-term functional outcome of dogs with severe injuries of the thoracolumbar spinal cord: 87 cases (1996-2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 6, p. 762-769, mar. 2003. DOI: 10.2460/javma.2003.222.762. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12675299/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

OLBY, Natasha. The pathogenesis and treatment of acute spinal cord injuries in dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, n. 5, p. 791-807, sep. 2010. DOI: 10.1016/j.cvsm.2010.05.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20732592/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

OLBY, N.; JEFERRY, N. Pathogenesis of diseases of the central nervous system. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 2003. p.1132-1147.

OLBY, Natasha *et al.* Time course and prognostic value of serum GFAP, pNFH, and S100 β concentrations in dogs with complete spinal cord injury because of intervertebral disc extrusion. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 33, n. 2, p.726-734, mar. 2019. DOI: 10.1111/jvim.15439. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30758078/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

OLBY, Natasha *et al.* Prognostic Factors in Canine Acute Intervertebral Disc Disease. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 26, n. 7, e596059, nov. 2020. DOI: 10.3389/fvets.2020.596059. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33324703/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

OLBY, Natasha J. *et al.* ACVIM consensus statement on diagnosis and management of acute canine thoracolumbar intervertebral disc extrusion. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.35, n.5. p.1570-1596, jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/jvim.16480>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jvim.16480>. Acesso em: 1 jul. 2023.

PARENT, Joane. Clinical approach and lesion localization in patients with spinal diseases. **Veterinary Clinics of the Small Animal**, v.40, n. 5, p.733-753, sep. 2010. DOI: [10.1016/j.cvsm.2010.07.001](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.001). Disponível em: [https://www.vetsmall.theclinics.com/article/S0195-5616\(10\)00088-4/fulltext](https://www.vetsmall.theclinics.com/article/S0195-5616(10)00088-4/fulltext). Acesso em: 2 jul. 2023.

POLTON, Gerry. Examining the risk of anal sac gland carcinoma in cocker spaniels. **Journal of Small Animals Practitce**, v. 49, n. 9, p. 557, sep. 2006. DOI: [10.1111/j.1748-5827.2006.00221.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2006.00221.x). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.2006.00221.x>. Acesso em: 1 jun. 2023.

POLTON, Gerry; BREARLY, Malcom. Clinical stage, therapy, and prognosis in canine anal sac gland carcinoma. **Jornal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 2, p. 274-280, mar. 2007. DOI: [10.1892/0891-6640\(2007\)21\[274:cstapi\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2007)21[274:cstapi]2.0.co;2). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.19391676.2007.tb02960.x?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 1 jul. 2023.

RAINER, Timothy H. *et al.* Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 562-569, apr. 2003. DOI: [10.1373/49.4.562](https://doi.org/10.1373/49.4.562). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12651807/>. Acesso em: 2 jun. 2023.

RIPPLINGER, Angel *et al.* Functional outcome in dogs undergoing hemilaminectomy for thoracolumbar disc extrusion but without nociception > 96 h: A prospective study. **The Veterinary Journal**, v.292, e105951, feb. 2023. DOI: [10.1016/j.tvjl.2023.105951](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2023.105951). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023323000023?via%3Di> hub. Acesso em: 1 jul. 2023.

RIVLIN, Alex S.; TATOR, Charles H. Effect of vasodilators and myelotomy on recovery after acute spinal cord injury in rats. **Journal of Neurosurgery**, v. 50, n. 3, p.349-352, 1979. DOI: [10.3171/jns.1979.50.3.0349](https://doi.org/10.3171/jns.1979.50.3.0349). Disponível em: <https://thejns.org/view/journals/j-neurosurg/50/3/article-p349.xml>. Acesso em: 2 jul. 2023.

ROERIG, A *et al.* Cerebrospinal fluid tau protein as a biomarker for severity of spinal cord injury in dogs with intervertebral disc herniation. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 253- 258, aug. 2013. DOI: [10.1016/j.tvjl.2013.02.005](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.02.005). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23499240/>. Acesso em: 6 jun. 2023.

ROSENBLATT, Alana J.; BOTTEMA, Cynthia. D. K.; HILL, Peter. B. Radiographic scoring for intervertebral disc calcification in the Dachshund. **The Veterinary Journal**, v. 200, n. 3, p. 355-361, jun. 2014. DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.03.023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023314001233>. Acesso em: 2 jul. 2023.

ROSS JT, SCAVELLI TD, MATTHIESEN DT, *et al*: Adenocarcinoma of the apocrine glands of the anal sac in dogs: a review of 32 cases, **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, n. 3, p. 316-320 27:349–355, 1991.

ROWLAND, James W. *et al*. Current Status of Acute Spinal Cord Injury Pathophysiology and Emerging Therapies: Promise on the Horizon. **Neurosurgical Focus**, v. 25, n. 5, E2, 2008. DOI: 10.3171/FOC.2008.25.11.E2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18980476/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

SALVI, Samanta *et al*. Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights. **OncoTargets and Therapy**, v. 25, n. 9, p. 6549-6559, oct. 2016. DOI: 10.2147/OTT.S100901. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27822059/>. Acesso em: 3 jun. 2023.

SCOTT, H. W.; MCKEE, W. M. Laminectomy for 34 dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease and loss of deep pain perception. **Journal of Small Animal Practice**, v. 40, n. 9, p.417-422, sep. 1999. DOI: 10.1111/j.1748-5827.1999.tb03114.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1748-5827.1999.tb03114.x>. Acesso em: 2 jul. 2023.

SEIM III, H. B. Cirurgia da espinha toracolombar. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2005. cap. 40, p. 1259-1291.

SOZZI, Gabriella *et al*. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 21, p. 3902-3908, nov. 2003. DOI: 10.1200/JCO.2003.02.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14507943/>. Acesso em: 3 jun. 2023.

SHAO, Xuefeng *et al*. Quantitative analysis of cell-free DNA in ovarian cancer. **Oncology Letters**, v. 10, n. 6, p. 3478-3482, dec. 2015. DOI: 10.3892/ol.2015.3771. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4665352/>. Acesso em: 3 jun. 2023.

SHAPIRO, Bernard *et al*. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. **Cancer**, v. 51, n.1, p. 2116-2120, jun. 1983. DOI: 10.1002/1097-0142(19830601)51:11<2116::aid-cncr2820511127>3.0.co;2-s. Disponível em: [https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(19830601\)51:11%3C2116::AID-CNCR2820511127%3E3.0.CO;2-S](https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(19830601)51:11%3C2116::AID-CNCR2820511127%3E3.0.CO;2-S). Acesso em 2 jun. 2023.

SHARP, N. J. H.; WHEELER, S. J. **Small animal spinal disorders: diagnosis and surgery**. 2nd ed., Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005.

SMOLDERS, Lucas A. *et al.* Intervertebral disc degeneration in the dog. Part 2: chondrodystrophic and non-chondrodystrophic breeds. **The Veterinary Journal**, v. 195, n. 3, p. 292-299, mar. 2013. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.10.011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23154070/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

SNYDER, Matthew W. *et al.* Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. **Cell**, v. 164, n. 1-2, p. 57-68, jan. 2016. DOI: 10.1016/j.cell.2015.11.050. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(15\)01569-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS009286741501569X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(15)01569-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS009286741501569X%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 2 jul. 2023.

STARK, Amy C. *et al.* Evaluation of cell-free DNA as a diagnostic marker in cerebrospinal fluid of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 81, n. 5, p. 416-421, may. 2020. DOI: 10.2460/ajvr.81.5.416. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32343180/>. Acesso em: 2 jun. 2023.

STROUN, M. *et al.* The origin and mechanism of circulating DNA. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 906, p. 161-168, apr. 2000. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06608.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10818614/>. Acesso em: 3 jun. 2023.

STROUN, M. *et al.* About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. **Clinical Chimica Acta**, v. 313, n. 1, p. 139-142, nov. 2001a. DOI: 10.1016/s0009-8981(01)00665-9. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009898101006659?via%3Dihub>. Acesso em: 4 jun. 2023.

STROUN, M. *et al.* Alu repeat sequences are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serum DNA: evidence for a preferential release from viable cells?. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 945, p. 258-264, sep. 2001b. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03894.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11708488/>. Acesso em 2 jun. 2023.

SUMMERS, B. A. *et al.* Injuries to the central nervous system. In: **Veterinary Neuropathology**. St. Louis: Ed. Mosby, 1995. cap.4, p.189-207.

SUNDARESAN, Tilak K.; HABER, Daniel A. Does molecular monitoring matter in early-stage breast cancer?. **Science Translation Medicine**, v. 7, n. 302, e302fs35, aug. 2015. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac9445. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26311727/>. Acesso em: 4 jun. 2023.

SWARUP, Vishnu; RAJESWARI, M. R. Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. **FEBS**

Letters, v. 581, n. 5, p. 795-799, mar. 2007. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.01.051. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17289032/>. Acesso em: 1 jul. 2023.

SZPEHCINSKI, A. et al. Evaluation of fluorescence-based methods for total vs. amplifiable DNA quantification in plasma of lung cancer patients. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59, n. 6, p. 675-681, dec. 2008. PMID: 19218694. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19218694/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

TAGAWA, Michihito *et al.* Quantification of plasma cell-free DNA levels in dogs with various tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 31, n. 6, p. 836-843, nov. 2019. DOI: 10.1177/1040638719880245. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31585514/>. Acesso em: 4 jun. 2023.

TATOR, C. H.; FEHLINGS, M. G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. **Journal of Neurosurgery**, v.75, n. 1, p.15-26, jul. 1991. DOI: 10.3171/jns.1991.75.1.0015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2045903/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

TAN, E. M. *et al.* Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 45, n. 11, p. 1732-1740, nov. 1966. DOI: 10.1172/JCI105479. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC292857/#>. Acesso em: 2 jun. 2023.

THOMAS, William B.; RISIO, Luisa De. History, neurologic examination, and neuroanatomic localization for spinal cord and nerve root disease. **Advances in intervertebral disc disease in dogs and cats**. Ames: Wiley Blackwell, 2015. p.91-106.

TOOMBS, J. P.; BAUER, M. S. Afecção do disco intervertebral. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. v. 1. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998, cap. 75, p. 1287-1305.

TOOMBS, J. P.; WATERS, D. J. Afecção do disco intervertebral. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2007. p. 1193-1208.

TROTTER E. J. 1996. Laminectomia dorsal para o tratamento da discopatia tóraco-lombar, p.572-584. In: Bojrab M. J.; Birchard S. J.; Tomlinson J. L. (Eds). **Técnicas Atuais em Cirurgia de Pequenos Animais**. 3a ed. Roca, São Paulo.

TRUSZEWSKA, Anna; FORONCEWICZ, Bartosz; PAÇZEK, L. The role and diagnostic value of cell-free DNA in systemic lupus erythematosus. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 35, n. 2, p. 330-336, mar. 2017. PMID: 27908304. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27908304/>. Acesso em: 5 jun. 2023.

TSAI, Nai-Wen *et al.* The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients with acute ischemic stroke. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 5, p. 476-479,

feb. 2011. DOI: 10.1016/j.cca.2010.11.036. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21130757/>. Acesso em: 5 jun. 2023.

TSUMITA, Toru; IWANAGA, Michiko. Fate of injected deoxyribonucleic acid in mice. **Nature**, v. 198, p. 1088-1089, jun. 1963. DOI: 10.1038/1981088a0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1981088a0>. Acesso em: 1 jul. 2023.

TUREK, M.M.; WITHROW, S.J. Perianal tumors. In: *WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology***. Philadelphia: Saunders, 5.ed, 2012, p. 423-431.

ULRICH, Bryan C.; PAWELETZ, Cloud P. Cell-Free DNA in Oncology: Gearing up for Clinic. *Annals of Laboratory Medicine*, v. 38, n. 1, p. 1-8, jan. 2018. DOI: 10.3343/alm.2018.38.1.1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29071812/>. Acesso em: 3 jun. 2023.

VAN DER VAART, Maniesh; PRETORIUS, Piet. Circulating DNA. Its origin and fluctuation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1197, p. 18-26, aug. 2008. DOI: 10.1196/annals.1448.022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18837919/>. Acesso em: 2 jun. 2023.

WHEELER, S. J.; SHARP, N. J. H. Anatomia funcional. In **Diagnóstico e tratamento cirúrgico das afecções espinais do cão e do gato**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1999, cap 01, p 8-20.

WITHROW, Stephen; VAIL, David M.; PAGE, Rodney. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 5 ed. Philadelphia: Saunders, 2012.

WITSBERGER, Tige H. *et al.* Associations between cerebrospinal fluid biomarkers and long-term neurologic outcome in dogs with acute intervertebral disk herniation. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 240, n. 5, p. 555-562, mar. 2012. DOI: 10.2460/javma.240.5.555. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22332624/>. Acesso em: 7 jun. 2023.

ZIPPER, Hubert *et al.* Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 12, e103, jul. 2004. DOI: 10.1093/nar/gnh101. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC484200/>. Acesso em: 2 jul. 2023.