

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**U LISBOA**

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO CANABIDIOL EM GATOS COM  
GENGIVOESTOMATITE CRÓNICA FELINA

DANIELA ALEXANDRA DOS REIS E SANTOS SILVA

ORIENTADOR(A):  
Doutora Lisa Alexandra Pereira Mestrinho

2024

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**U LISBOA**

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO CANABIDIOL EM GATOS COM  
GENGIVOESTOMATITE CRÓNICA FELINA

DANIELA ALEXANDRA DOS REIS E SANTOS SILVA

DISSERTAÇÃO DE Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor Luis Miguel Alves Carreira

ORIENTADOR(A):

Doutora Lisa Alexandra Pereira Mestrinho

VOGAIS:

Doutora Lisa Alexandra Pereira  
Mestrinho

Doutora Maria Teresa de Costa  
Mendes Vítor Villa de Brito

2024

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Daniela Alexandra dos Reis e Santos Silva

Título da Tese ou Dissertação: Avaliação do efeito anti-inflamatório do canabidiol em gatos com gengivoestomatite crónica felina

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2024

Designação do curso de  
Mestrado ou de  
Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica  Produção Animal e Segurança Alimentar  
 Morfologia e Função  Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de  6 meses,  12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 29 de fevereiro de 2024

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: Daniela Alexandra Silva

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, um agradecimento do tamanho do universo à minha mãe, a mulher que aturou manhãs, tardes e noites de dúvidas existenciais, e que me ensinou que, independentemente de todos os obstáculos e tropeções, tudo é possível se lutarmos por isso. Não há palavras que façam jus a toda a confiança, resiliência e apoio incondicional.

À minha orientadora, a Professora Doutora Lisa Mestrinho, imparável e sempre pronta a ajudar. Nunca teria aprendido e experienciado tudo o que vivi neste último ano sem os desafios que me propôs e, por isso, um muito obrigado.

A toda a equipa do Hospital Escolar Veterinário, por toda a disponibilidade e persistência em ensinar. A todos os que perderam 15 minutos do seu trabalho para me ajudar a abrir bocas desdentadas e a conter gatos a tentar trepar paredes, vocês foram incansáveis! Aos serviços de estomatologia e cirurgia e, em especial, à Doutora Joana Coelho - este estudo não teria sido concluído sem a sua infinita paciência, auxílio, e registos fotográficos maravilhosos.

Ao Professor Frederico Silva por toda a disponibilidade, e à Isa Moutinho pelas tardes do seu trabalho dispensadas a aturar-me para eu poder ter resultados. Conseguimos!

Ao Professor Telmo Nunes, pela tranquilidade e paciência a ajudar-me a realizar a análise estatística que, na verdade, foi um milagre eu ter conseguido executar.

A todos os detentores dos animais incluídos neste estudo, um grande obrigado por toda a compreensão e disponibilidade para embarcarem neste desafio comigo.

Como ainda não falei o suficiente sobre paciência, um agradecimento especial ao meu namorado que, com calma, descontração e muita calma mesmo, esteve sempre presente e de coração pronto a incentivar-me a seguir em frente.

Aos meus mais pequeninos que ocupam um espaço gigante no meu coração, Mini, Menta, Demjin e estrelinhas que me motivaram a seguir este percurso e que me acompanham desde sempre que me lembro. Prometo alcançar o inalcançável por vocês, e esta foi apenas a primeira etapa de muitas que trabalharei por superar com o melhor de mim.

E como os últimos são sempre os primeiros, à minha família de coração, fígado e pulmão: Nevis, Miguel, Gabe e Tilde (e claro, Buziquinho!). Dizem que os anos de faculdade são os melhores anos das nossas vidas, e vocês certificaram-se de colocar a fasquia insuperável. Pelos serões de confidências e gargalhadas, um obrigado gigante por terem sido os pilares destes 6 anos inesquecíveis.

## **APOIOS FINANCEIROS**

O presente estudo foi financiado pelo Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, financiamento interno com referência Bic22Nov-01.

# AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO CANABIDIOL EM GATOS COM GENGIVOESTOMATITE CRÓNICA FELINA

## Resumo

A gengivoestomatite crónica felina (GECF) é uma doença inflamatória dolorosa da cavidade oral do gato, de etiologia multifatorial e cujo tratamento tem sido um desafio. O canabidiol (CBD) é um fitocanabinoide não psicotrópico, com propriedades neuroprotetoras, analgésicas e anti-inflamatórias.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial anti-inflamatório do CBD em gatos com GECF submetidos a extrações dentárias e refratários a outros tratamentos, através da medição de proteínas de fase aguda (PFA).

Foi realizado um estudo prospetivo, randomizado, duplamente cego que dividiu a amostra num grupo medicado com CBD (grupo CBD, n=4) e num grupo medicado com placebo (grupo PLAC, n=4). A formulação em óleo, contendo CBD ou não (o placebo) foi fornecida para ser administrada oralmente na dose de 2 mg/kg a cada 12 horas, durante 30 dias. Foram recolhidas amostras sanguíneas aos dias 0 e 30 do estudo para medição de três PFA – alfa-1 glicoproteína ácida (AGP), proteína amilóide sérica A (SAA), e albumina. Foram realizadas reavaliações semanais para registo do peso e do índice de atividade da doença (classificação SDAI – *Stomatitis Disease Activity Index*). Para a análise estatística recorreu-se aos modelos lineares generalizados mistos e ao coeficiente de correlação de Spearman.

As concentrações da AGP, da SAA e os valores do rácio realizado entre a AGP e a albumina (AGP/Alb) reduziram significativamente do dia 0 para o dia 30 no grupo CBD ( $p=0,006$ ,  $p=0,026$  e  $p=0,002$ , respetivamente). Não se observou alterações significativas na concentração da albumina, no peso, e na classificação SDAI. Verificou-se uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre a AGP, a SAA e o rácio e a classificação SDAI, sendo a SAA a proteína que obteve uma relação mais forte com o SDAI ( $\rho=0,724$ ,  $p=0,002$ ).

Este estudo sugere que o CBD, administrado oralmente durante 30 dias, poderá ter um efeito anti-inflamatório benéfico em gatos com GECF.

**Palavras-chave:** gengivoestomatite crónica felina, canabidiol, inflamação, proteínas de fase aguda, SDAI.

# EVALUATION OF THE ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF CANNABIDIOL IN CATS WITH FELINE CHRONIC GINGIVOSTOMATITIS

## Abstract

Feline chronic gingivostomatitis (FCGS) is a painful inflammatory multifactorial disease of the feline oral cavity, with multifactorial etiology and whose treatment has been challenging. Cannabidiol (CBD) is a non-psychotropic phytocannabinoid with neuroprotective, analgesic, and anti-inflammatory properties.

The present study aimed to evaluate the anti-inflammatory potential of CBD in cats with FCGS that have undergone dental extractions and are refractory to other treatments, by measuring acute phase proteins (APP).

A prospective, randomized, double-blind study divided the sample into a group medicated with CBD (CBD group, n=4) and a group medicated with placebo (PLAC group, n=4). The formulation was oil based containing CBD or not (placebo) and was provided to be administered orally at a dose of 2 mg/kg every 12 hour for 30 days. Blood samples were collected on days 0 and 30 of the study to measure three APP - alpha-1 acid glycoprotein (AGP), serum amyloid protein A (SAA), and albumin. Weekly reassessments were carried out to record the weight and disease activity index (SDAI – *Stomatitis Disease Activity Index*). For statistical analysis, generalized linear mixed models and Spearman's Rank correlation coefficient were used.

AGP and SAA concentrations, and AGP to albumin ratio (AGP/Alb) reduced significantly from day 0 to day 30 in the CBD group ( $p=0.006$ ,  $p=0.026$  and  $p=0.002$ , respectively). No significant changes were noted in albumin concentration, weight, and SDAI score. There was a positive and statistically significant correlation between AGP, SAA, and AGP/Alb ratio and SDAI, with SAA being the protein that had the strongest correlation with SDAI ( $\rho=0.724$ ,  $p=0.002$ ).

This study suggests that CBD, administered orally for 30 days, may have a beneficial anti-inflammatory effect in cats with FCGS.

**Keywords:** feline chronic gingivostomatitis, cannabidiol, inflammation, acute phase proteins, SDAI.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	iii
APOIOS FINANCEIROS .....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
ÍNDICE .....	vii
ÍNDICE DE EQUAÇÕES .....	xi
ÍNDICE DE TABELAS .....	xii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	xiv
INTRODUÇÃO .....	1
PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR .....	2
PARTE II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
1. Gengivoestomatite crónica felina (GECF) .....	5
1.1. Considerações gerais.....	5
1.2. Etiopatogenia .....	5
1.3. Diagnóstico .....	6
1.4. Tratamento.....	7
1.4.1. Tratamento cirúrgico .....	7
1.4.2. Tratamento médico .....	9
2. Resposta inflamatória.....	11
2.1. Proteínas de fase aguda (PFA) .....	12
2.1.1. Funções das PFA.....	13
2.1.2. PFA como diagnóstico .....	14
2.1.3. Métodos de doseamento de PFA .....	15
2.1.4. Albumina .....	15
2.1.4.1. Albumina e a sua estrutura .....	15
2.1.4.2. Funções da albumina .....	16
2.1.5. Alfa-1 glicoproteína ácida (AGP) .....	17



2.1.5.1.	AGP e a sua estrutura.....	17
2.1.5.2.	Funções da AGP.....	18
2.1.6.	Proteína amilóide sérica A (SAA).....	19
2.1.6.1.	SAA e a sua estrutura.....	19
2.1.6.2.	Funções da SAA.....	20
3.	Canabidiol (CBD).....	21
3.1.	Caracterização.....	21
3.2.	Legislação.....	22
3.3.	O Sistema Endocanabinoide (SEC).....	22
3.3.1.	Recetores endocanabinoides.....	23
3.3.1.1.	CB1 e CB2.....	24
3.4.	Farmacocinética.....	25
3.5.	Ação Terapêutica.....	27
3.5.1.	Analgésico.....	27
3.5.2.	Anti-inflamatório.....	27
3.5.3.	Outros.....	28
3.6.	Efeitos adversos.....	29
PARTE III – ENSAIO CLÍNICO SOBRE A AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO CANABIDIOL EM GATOS COM GENGIVOESTOMATITE CRÓNICA.....		30
1.	Introdução.....	30
2.	Objetivos.....	30
3.	Materiais e Métodos.....	30
3.1.	Desenho de estudo.....	31
3.2.	Amostra.....	31
3.2.1.	Critérios de inclusão.....	31
3.2.2.	Critérios de exclusão.....	31
3.2.3.	Grupos e protocolo.....	31
3.2.4.	Atribuição dos casos recrutados pelos grupos.....	31
3.2.5.	Considerações éticas.....	32
3.3.	Procedimentos.....	32

3.3.1.	Consultas .....	32
3.3.2.	Recolha de amostras sanguíneas .....	32
3.3.3.	Doseamento da AGP .....	33
3.3.4.	Diluições seriadas da SAA .....	33
3.3.5.	Doseamento da SAA.....	33
3.3.6.	Doseamento da albumina .....	34
3.3.7.	Rácio AGP/Alb .....	34
3.3.8.	Análise estatística .....	34
4.	Resultados .....	35
4.1.	Caracterização da amostra .....	35
4.2.	Comparação entre grupos.....	35
4.2.1.	Peso.....	35
4.2.2.	Classificação SDAI.....	36
4.2.3.	Concentração de AGP .....	38
4.2.4.	Concentração de SAA.....	40
4.2.4.1.	Diluição da amostra para execução do Kit ELISA .....	40
4.2.4.2.	Resultados de SAA .....	40
4.2.5.	Concentração de albumina .....	41
4.2.6.	Rácio AGP/Alb .....	42
4.3.	Efeitos adversos.....	44
4.4.	Palatabilidade.....	45
4.5.	Desistências.....	45
4.6.	Resgates analgésicos .....	46
4.7.	Correlação entre PFA e a classificação SDAI.....	46
4.7.1.	AGP-SDAI.....	46
4.7.2.	SAA-SDAI .....	46
4.7.3.	Albumina- SDAI.....	47
4.7.4.	Rácio AGP/Alb-SDAI.....	47
4.8.	Correlação entre o Rácio AGP/Alb e a SAA .....	48
5.	Discussão .....	49

5.1. Efeito do CBD .....	50
5.2. Relação das PFA com a gravidade da GECF.....	56
5.3. Limitações do estudo .....	57
6. Conclusões .....	58
BIBLIOGRAFIA .....	59
ANEXOS .....	65
Anexo 1 – Certificado de participação na organização dos cursos Soft Tissue Surgery II e IV, promovidos pela European School of Advanced Veterinary Studies.....	65
Anexo 2 – Parecer de aprovação da Comissão de Ética para a Investigação e Ensino (CEIE) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.....	66
Anexo 3 – Termo de consentimento informado preenchido pelos detentores para autorizar a inclusão dos seus animais no estudo. ....	67
Anexo 4 – Questionário de classificação SDAI preenchido pelos detentores semanalmente durante o decorrer do estudo (Reiter et al. 2019). ....	68
Anexo 5 – Questionário de classificação SDAI preenchido pelo clínico semanalmente durante o decorrer do estudo (Reiter et al. 2019). ....	69

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Índice de fase aguda numa formulação matemática (adaptado de Gruys et al. 2006).....	14
--	----

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Procedimentos realizados semanalmente durante os 30 dias do estudo.....	32
Tabela 2 - Caracterização da amostra.....	35
Tabela 3 - Valores do Peso nos gatos medicados com CBD e com Placebo, semanalmente, durante o tratamento. ....	36
Tabela 4 - Valores da classificação SDAI nos gatos medicados com CBD e com Placebo, semanalmente, durante o tratamento. ....	37
Tabela 5 - Avaliação estatística por GLMM do SDAI e do Peso, entre o grupo CBD e o grupo PLAC, ao dia 0, 7, 15, 21 e 30. ....	38
Tabela 6 - Concentração de AGP nos gatos medicados com CBD e com Placebo, antes e depois do tratamento.....	39
Tabela 7 - Valores de absorvância consoante as diferentes diluições das duas amostras de soro com níveis extremos de inflamação sistémica. ....	40
Tabela 8 - Concentração de SAA nos gatos medicados com CBD e com Placebo, antes e depois do tratamento.....	41
Tabela 9 - Concentração de Albumina nos gatos medicados com CBD e com Placebo, antes e depois do tratamento.....	42
Tabela 10 - Valores do Rácio AGP/Alb nos gatos medicados com CBD e com Placebo, antes e depois do tratamento.....	43
Tabela 11 - Avaliação estatística por GLMM da AGP, SAA, Albumina e Rácio AGP/Alb, entre o grupo CBD e o grupo PLAC, ao dia 0 e 30 após tratamento.....	44
Tabela 12 - Número de casos que apresentaram efeitos adversos, no grupo CBD e no grupo PLAC.....	45
Tabela 13 - Casos que desistiram, no grupo CBD e no grupo PLAC.....	46
Tabela 14 - Correlação entre a concentração das proteínas e o SDAI, entre o Rácio AGP/Alb e o SDAI, e entre a SAA e o Rácio AGP/Alb. ....	49

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Tipologia de cirurgias assistidas durante a rotação de cirurgia. ....	4
Gráfico 2 - Tipologia de cirurgias executadas como ajudante de cirurgia. ....	4
Gráfico 3 - Representação gráfica do peso dos animais, no grupo PLAC e no grupo CBD, ao dia 0, 7, 15, 21 e 30.....	36
Gráfico 4 - Representação gráfica da classificação SDAI, no grupo PLAC e no grupo CBD, ao dia 0, 7, 15, 21 e 30.....	37
Gráfico 5 - Representação gráfica da concentração da AGP, no grupo PLAC e no grupo CBD, ao dia 0 e 30. ....	39
Gráfico 6 - Representação gráfica da concentração da SAA, no grupo PLAC e no grupo CBD, ao dia 0 e 30. ....	41
Gráfico 7 - Representação gráfica da concentração da Alb, no grupo PLAC e no grupo CBD, ao dia 0 e 30. ....	42
Gráfico 8 - Representação gráfica do valor do Rácio AGP/Alb, no grupo PLAC e no grupo CBD, ao dia 0 e 30. ....	43
Gráfico 9 - Representação gráfica do número de animais que ingeriu o óleo com e sem comida. ....	45
Gráfico 10 - Representação gráfica da correlação entre a concentração de AGP e a classificação SDAI.....	46
Gráfico 11 - Representação gráfica da correlação entre a concentração de SAA e a classificação SDAI.....	47
Gráfico 12 - Representação gráfica da correlação entre a concentração de Albumina e a classificação SDAI.....	47
Gráfico 13 - Representação gráfica da correlação entre o Rácio AGP/Alb e a classificação SDAI.....	48
Gráfico 14 - Representação gráfica da correlação entre o Rácio AGP/Alb e a concentração de SAA.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

2-AG – 2 araquidonilglicerol

AEA – Anandamida

AGP – Alfa-1 Glicoproteína Ácida

AINE – Anti-Inflamatório Não Esteroide

APR – Resposta de fase aguda (do inglês *Acute Phase Response*)

CB1 – Recetor de Canabinoides do tipo 1

CB2 – Recetor de Canabinoides do tipo 2

CBD – Canabidiol

CRP – Proteína C Reativa

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

FCV – Calicivírus Felino

FeLV – Vírus da Leucemia Felina

FHV-1 – Herpesvírus Felino

FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina

GECF – Gengivoestomatite Crónica Felina

GLMM – Modelos Lineares Generalizados Mistos

HDL – Lipoproteínas de Alta Densidade (do inglês *High Density Lipoprotein*)

HEV-FMV – Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

kDa – Do inglês *kilodalton*

MSC – Célula Mesenquimatosa do Estroma (do inglês *Mesenchymal Stem Cells*)

PAAF – Punção Aspirativa de Agulha Fina

PFA – Proteína de Fase Aguda

PIF – Peritonite Infeciosa Felina

PLAC – Placebo

rFeIFN-u – Interferão Recombinante Ómega Felino

Rho – Coeficiente de Correlação

SAA – Proteína Amilóide Sérica A

SDAI – Do inglês *Stomatitis Disease Activity Index*

SEC – Sistema Endocanabinoide

SNC – Sistema Nervoso Central

THC – Tetrahydrocannabinol

TNF – Fator de Necrose Tumoral



## INTRODUÇÃO

A cavidade oral é revestida pela mucosa oral e divide-se em vestíbulo oral e cavidade oral propriamente dita. O vestíbulo oral é o espaço entre os lábios ou bochechas e os dentes e gengiva, e a cavidade oral propriamente dita é constituída rostral e lateralmente pela arcada dentária, dorsalmente pelo palato duro e mole, ventralmente pelo pavimento da cavidade oral e língua, e estende-se até à orofaringe (Lemmons and Beebe 2019). Este conjunto de estruturas anatómicas está envolvido na preensão, mastigação, deglutição, vocalização e respiração (Mestrinho et al. 2015).

Existem numerosos processos inflamatórios que envolvem a cavidade oral de gatos, nomeadamente doença periodontal, reabsorção dentária, complexo granuloma eosinofílico e gengivoestomatite crónica felina (GECF) (Mestrinho et al. 2015). Dentro destas, a GECF é uma doença bastante desafiante para o clínico, uma vez que possui uma etiologia multifatorial e ainda não foi possível encontrar um tratamento consistente e eficaz, consequência da sua complexa etiopatogenia (Winer et al. 2016).

Assim, a presente dissertação tem como objetivo avaliar o potencial anti-inflamatório do canabidiol em gatos no contexto da GECF, sendo constituída por três partes. A primeira parte descreve as atividades realizadas durante o estágio curricular, nos vários serviços do Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária. A segunda parte consiste numa revisão bibliográfica focada nos seguintes temas: a GECF, o processo inflamatório e três proteínas de fase aguda componentes do mesmo, e o canabidiol como potencial fármaco analgésico e anti-inflamatório adjuvante da GECF. A terceira e última parte expõe um estudo prospetivo, de avaliação da evolução de três proteínas de fase aguda em 8 gatos com gengivoestomatite crónica, refratários a outros tratamentos, medicados com canabidiol durante 30 dias.

## **PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR**

No âmbito do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária, o meu estágio curricular decorreu entre 5 de setembro de 2022 e 2 de março de 2023, no Hospital Escolar Veterinário (HEV) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), sob orientação da Professora Doutora Lisa Mestrinho na área de Medicina e Cirurgia de Animais de Companhia. Este estágio teve a duração de 26 semanas, perfazendo cerca de 958 horas. Sendo o HEV um hospital de referência, foi possível fazer rotações nos diferentes serviços do hospital, nomeadamente Medicina Geral, Radiologia, Medicina Interna, Oncologia, Ecografia, Dermatologia, Oftalmologia, Perda de Peso e Exóticos, Unidade de Isolamento e Contenção Biológica, Internamento e Cirurgia.

Em todos os serviços tive oportunidade de assistir e iniciar consultas, recolher a anamnese, realizar exames físicos e, posteriormente, discutir com os clínicos do serviço os sinais clínicos, os exames complementares de diagnóstico a realizar, os diagnósticos diferenciais mais prováveis e os tratamentos. Em cada rotação, executei tarefas específicas de cada especialidade.

No serviço de Medicina Geral (6 semanas) assisti às consultas de urgência e de marcações. Treinei a redação de receitas farmacológicas e fiz o acompanhamento telefónico com alguns detentores. Realizei recolhas sanguíneas e de urina, selecionei os tubos correspondentes e preenchi as requisições de análises para dar seguimento às mesmas para os diversos laboratórios. Assisti também à realização de procedimentos de eutanásia.

No serviço de Radiologia (2 semanas) assisti à realização de radiografias de várias regiões, onde selecionei as constantes radiográficas, posicionei o animal, descrevi e interpretei os achados radiográficos. Alternando com os exames radiográficos, auxiliei também em tomografias computadorizadas, onde assisti à elaboração de relatórios. Em ambos os exames imagiológicos preparei e monitorizei a sedação e/ou anestesia e pratiquei a entubação endotraqueal e colocação de cateteres.

No serviço de Medicina Interna (2 semanas) participei nas consultas de referência do serviço, tanto primeiras consultas como consultas de seguimento. Interpretámos os resultados de análises sanguíneas de vários pacientes e assisti a endoscopias do aparelho gastrointestinal e respiratório.

No serviço de Oncologia (2 semanas) acompanhei sessões de quimioterapia, onde aprendi a manipular os diferentes quimioterápicos e o seu método de atuação. Assisti às consultas de especialidade e à realização de punções aspirativas de agulha fina (PAAF) de várias estruturas.

No serviço de Ecografia (1 semana) assisti à realização de exames ecográficos abdominais, reprodutivos e, em menor escala, cardíacos, identificando as várias estruturas. Realizei a tricotomia e o posicionamento do animal para a ecografia e para PAAF's ecoguiadas. Executei colheitas de urina por cistocentese e ajudei na redação de relatórios. Tive ainda a possibilidade de assistir à colocação de um cateter venoso central.

No serviço de Dermatologia (2 semanas) participei nas consultas do serviço, onde realizei tricogramas, raspagens cutâneas superficiais e profundas, citologias por aposição de fita-cola e citologias auriculares, coloração das lâminas com o método Diff-Quick e visualização das mesmas ao microscópio ótico, com identificação dos microrganismos presentes. Interpretei testes de sensibilidade a antibióticos, assisti a biópsias cutâneas e a vídeo-otoscopias.

No serviço de Oftalmologia (2 semanas) assisti às consultas da especialidade, onde executei exames oftalmológicos completos, participei em eletrorretinografias e ecografias oculares, e assisti a cirurgias oftálmicas como enucleações e remoção de nódulos palpebrais.

No serviço de Perda de Peso e Exóticos (1 semana), passei dois dias na especialidade de Perda de Peso, e três dias no serviço de Exóticos.

- Nas consultas de perda de peso assisti ao exame físico de animais com diversas condições corporais e à implementação das dietas indicadas consoante o historial e condição física do animal e objetivos a atingir.
- Nas consultas de animais exóticos assisti na contenção de diversas espécies, participei em consultas da especialidade, e auxiliei na monitorização de anestesia de exóticos em cirurgias.

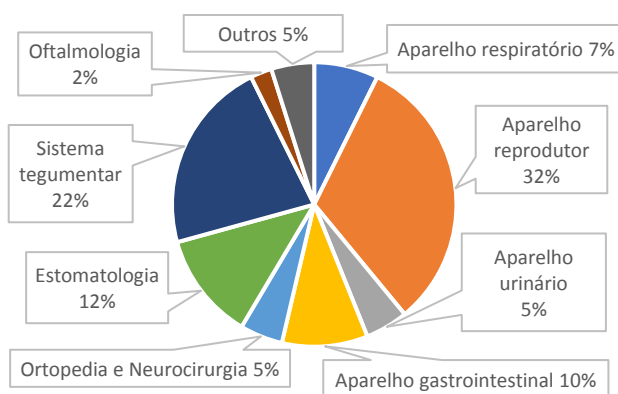
Na Unidade de Isolamento e Contenção Biológica (1 semana) executei exames físicos e preparei e administrei medicação, seguindo os corretos protocolos de biossegurança de forma a ganhar prática na segura manipulação de animais com doenças infetocontagiosas e prevenindo a disseminação das mesmas.

No Internamento (3 turnos noturnos e 1 turno diurno de 12h cada) ganhei mais autonomia na preparação de medicação, administração da mesma consoante as diferentes vias (endovenosa, subcutânea, intramuscular, oral, e gotas oculares), colocação de cateteres, cálculo da taxa de fluidoterapia e suplementação de soros, realização de pensos simples e monitorização dos animais internados. Assisti ainda às discussões dos casos clínicos aquando da troca de turnos e à execução de notas de alta.

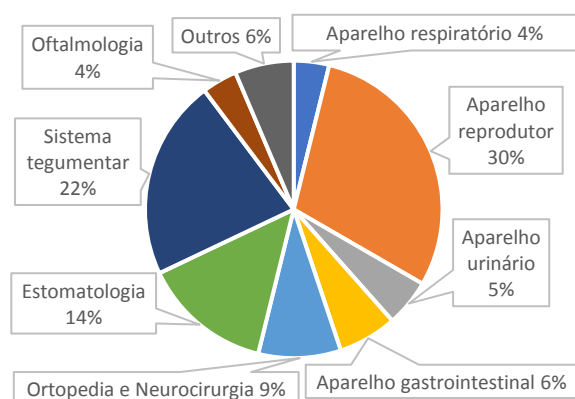
O serviço de Cirurgia (7 semanas) foi onde passei mais tempo, onde adquiri prática na realização de procedimentos pré-cirúrgicos como preparação e administração de pré-

medicação, colocação de cateteres, indução anestésica, colocação de tubos endotraqueais, tricotomia e assepsia. Recebi os animais, realizei as questões de rotina aos detentores para a entrada do animal no serviço de cirurgia. Participei como ajudante de cirurgião, onde realizei pequenos procedimentos como orquiectomias de cão e gato, remoção de pequenos nódulos, destartarizações e polimentos dentários, e suturas; e monitorizei anestésias e o recobro pós-cirúrgico (Gráfico 1 e 2). Assisti também na colocação de tubos de alimentação por esofagostomia e em radiografias intraorais.

**Gráfico 1 - Tipologia de cirurgias assistidas durante a rotação de cirurgia.**



**Gráfico 2 - Tipologia de cirurgias executadas como ajudante de cirurgião.**



Para além dos serviços de especialidade onde fui escalonada, acompanhei também a Professora Doutora Lisa Mestrinho nas suas consultas de especialidade do Serviço de Estomatologia, uma vez por semana.

Após o término do estágio curricular no HEV-FMV, permaneci 5 semanas adicionais no Serviço de Cirurgia, e pude continuar a acompanhar o Serviço de Estomatologia nas suas consultas semanais. Nesse período adicional continuei a recolha de casos para o estudo para a presente dissertação e para outros dois projetos na coordenação da Professora Doutora Lisa Mestrinho. Tive também a oportunidade de ajudar a organizar e participar na componente prática do curso de Cirurgia em Tecidos Moles II e IV da *European School for Advanced Veterinary Studies* (ESAVS). Este foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária nos dias 20 e 22 de junho, e 12 e 14 de setembro de 2023, respetivamente. As temáticas abordadas em cada curso incluíram cirurgia cutânea e perineal (II) e cirurgia da cabeça e do pescoço (IV) (Anexo 1).

## PARTE II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Gengivoestomatite crônica felina (GECF)

#### 1.1. Considerações gerais

A gengivoestomatite crônica felina é uma doença inflamatória da cavidade oral do gato muito dolorosa e debilitante, com uma prevalência de 0,7% a 12% (Lee et al. 2020). Manifesta-se por lesões inflamatórias ulcerativas e/ou proliferativas da mucosa oral, nomeadamente da mucosa bucal, gengival, lingual e dos pilares glossopalatinos (Lee et al. 2020, Hussain et al. 2021). É caracterizada por uma inflamação crônica predominantemente linfoplasmocitária, mediada maioritariamente por células T citotóxicas (CD8+), e algumas células CD4+ (Arzi et al. 2020) e uma concentração salivar elevada de globulinas (principalmente IgG e IgM) e albumina, provavelmente devido ao transporte das mesmas dos vasos para a saliva (Harley et al. 2003). A GECF é diferenciada da gengivite quando as lesões ultrapassam a linha mucogengival e se estendem para a mucosa oral vestibular, lingual, palatina e caudal a orofaríngea (Winer et al. 2016).

#### 1.2. Etiopatogenia

A etiopatogenia desta doença continua a ser um forte ponto de investigação uma vez que se encontram múltiplos agentes associados a uma resposta imune alterada (Winer et al. 2016, Lee et al. 2020).

Os vírus são potenciais agentes desencadeadores da GECF, como o calicivírus (FCV), o herpesvírus (FHV-1), o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV). Comparativamente a gatos saudáveis, a infeção por FCV mostrou-se a mais prevalente e significativamente mais incidente em gatos com esta doença, e frequentemente em coinfeção com FHV-1 (Lommer and Verstraete 2003, Winer et al. 2016, Lee et al. 2020).

Nos animais afetados com GECF tem sido estudado a ocorrência de disbiose, com um desvio da microbiota para bactérias Gram-negativas e anaeróbias (Dolieslager et al. 2011, Lee et al. 2020). Verificou-se uma maior diversidade da microbiota em gatos saudáveis comparativamente a gatos com GECF, com maior expressão de *Pasteurella multocida* em gatos doentes, comparativamente com outras bactérias orais comensais (Dolieslager et al. 2011). Outras bactérias como *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae*, *Tannerella forsythia* e bactérias da placa bacteriana também mostraram ter um papel importante na GECF (Hussain et al. 2021).

Para além dos agentes infetocontagiosos, vários estudos têm incidido nos fatores ambientais como fatores de risco para GECF, nomeadamente o acesso ao exterior e o

contacto com outros gatos em espaços fechados, tais como abrigos e gatis. Este tipo de comportamento leva a um aumento do stress ambiental e permite reinfeções de gatos suscetíveis devido ao contacto com vírus disseminados por portadores crónicos (Peralta and Carney 2019, Reiter et al. 2019, Lee et al. 2020, Kim et al. 2023).

Outras alterações dentárias como a periodontite e a reabsorção dentária estão frequentemente associadas a GECF, contribuindo para a perpetuação da inflamação oral (Reiter et al. 2019, Lee et al. 2020). Desta forma, é essencial o diagnóstico e tratamento destas comorbidades em gatos com GECF (Lee et al. 2020).

Os gatos nesta condição apresentam sinais de dor oral como vocalização e agressividade perante a apresentação de alimento, disfagia, anorexia, desidratação, perda de peso, diminuição dos hábitos de higiene e sialorreia (Healey et al. 2007, Mestrinho et al. 2015, Peralta and Carney 2019, Kim et al. 2023). A halitose e linfadenopatia mandibular também são sinais descritos (Peralta and Carney 2019). Uma vez que a gravidade desta síndrome varia de caso a caso, foi criada uma escala (*stomatitis disease activity index* – SDAI) e um inquérito aos detentores para pontuar e estadear a doença (Reiter et al. 2019).

### **1.3. Diagnóstico**

O diagnóstico de GECF deve ser realizado de forma sistemática e antes do aparecimento de alterações irreversíveis. É essencial a colheita de anamnese e um exame clínico oral minuciosos (Reiter et al. 2019). Idealmente o exame clínico da cavidade oral deve ser realizado sob sedação, de forma a prevenir comportamentos agressivos aquando da manipulação, fuga e/ou vocalização (Mestrinho et al. 2015). Devem ser realizadas análises laboratoriais hematológicas, serológicas e pesquisa de vírus como FIV, FeLV, FHV-1 e FCV, e bactérias (Reiter et al. 2019).

A inflamação da mucosa oral é mais grave em gatos com GECF do que a observada noutras doenças dentárias. A presença de lesões inflamatórias para além da mucosa gengival, a sua aparência clínica e história podem ser suficientes para fundamentar o diagnóstico de GECF (Winer et al. 2016, Kim et al. 2023). No entanto, a biópsia é um método valioso para diagnosticar GECF (Kim et al. 2023), sendo a análise histopatológica útil para estabelecer o diagnóstico definitivo, distinguido esta afeção de outras doenças, como o carcinoma de células escamosas, e para classificar e perceber as lesões (Winer et al. 2016).

Um exame radiográfico intra-oral de todos os dentes é fundamental para avaliar aqueles afetados pela doença (Mestrinho et al. 2015), especialmente porque se recorrerá a extrações dentárias para o tratamento da GECF (Reiter et al. 2019, Lee et al. 2020) e também pela sua capacidade para diagnosticar doenças ocultas. Sabe-se que 42% de gatos com uma

cavidade oral considerada “normal” possuem doença que é diagnosticada radiograficamente, e esta percentagem é maior (54%) quando já apresentam alterações orais (Reiter et al. 2019).

Assim, o diagnóstico depende das características clínicas e da pouca resposta ao tratamento inicial, sendo a capacidade de reconhecer a sua apresentação clínica o mais precocemente possível essencial para prevenir as limitações decorrentes do desconforto oral que estes animais sentem (Hussain et al. 2021).

#### **1.4. Tratamento**

Devido à etiologia multifatorial da GECF, e à dificuldade de determinar a causa subjacente desta síndrome, ainda não foi possível descobrir um tratamento verdadeiramente eficaz (Winer et al. 2016). O principal objetivo do clínico é reduzir a carga antigénica oral, reduzir a dor e eliminar a inflamação dos tecidos (Reiter et al. 2019).

O manejo cirúrgico e o manejo médico são as duas abordagens possíveis para o tratamento da GECF. Muitos detentores, nas primeiras consultas, mostram-se reticentes acerca da realização de extrações dentárias parciais ou totais, por se tratar de um tratamento radical e irreversível, e dão preferência a outros tratamentos médicos (Cannon 2015, Hussain et al. 2021). No entanto, uma vez que o tratamento médico possui variadas consequências a longo-prazo, a intervenção cirúrgica é considerada, atualmente, como o tratamento convencional (Lee et al. 2020). Num estudo de Jennings et al. (2015), 67% dos gatos submetidos a extrações dentárias melhoraram substancialmente ou atingiram a cura clínica. No entanto, dentro destes, 68% necessitou ainda de manejo médico adicional por tempo finito no período pós-operatório imediato. Da totalidade da amostra, 33% não mostrou uma evolução favorável e manteve a medicação até à última reavaliação.

##### **1.4.1. Tratamento cirúrgico**

As extrações dentárias parciais (extração dos dentes molares e pré-molares, tipicamente associados a inflamação, periodontite grave e/ou lesões de reabsorção), ou totais evidenciaram, em vários estudos, que conduzem aos melhores resultados a longo prazo, com cerca de 70% a 80% dos gatos com melhorias clínicas (Cannon 2015, Winer et al. 2016). Em todos os gatos foi realizado manejo médico com antibióticos, anti-inflamatórios ou analgésicos no período de 15 dias pós-cirúrgicos. Apenas 20% a 30% não mostraram uma progressão favorável e precisaram sempre de manejo médico (Winer et al. 2016, Lee et al. 2020).

A resposta clínica às extrações dentárias não se relaciona com o número de extrações, sejam elas totais, parciais ou faseadas (Jennings et al. 2015, Silva et al. 2021). O princípio das extrações contribui para a redução de processos inflamatórios que perpetuam esta doença (lesões de reabsorção e doença periodontal) assim como da placa bacteriana. Por

este motivo, a recomendação é extrair todos os dentes próximos de áreas inflamadas (Cannon 2015) e os caninos e incisivos podem ser mantidos se não estiverem relacionados com as áreas de inflamação (Cannon 2015, Lee et al. 2020).

No período pré-cirúrgico, devido ao seu cariz invasivo uma vez que se realizam retalhos e alveolotomias, recomenda-se antibioterapia de largo espectro durante 7 dias. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) também são recomendados para reduzir a dor e desconforto oral, assim como opioides orais como a buprenorfina (Cannon 2015, Reiter et al. 2019).

Idealmente, o procedimento deve ser executado por um médico veterinário dentista, uma vez que a extração dentária em gatos com GECF é um procedimento tecnicamente complexo, tanto pela necessidade de uma avaliação minuciosa dente a dente, como pelas várias alterações observáveis nos dentes afetados, nomeadamente anquilose das raízes ao osso alveolar e perda de integridade por reabsorções, que dificultam o procedimento. Devem ser realizados bloqueios nervosos loco-regionais aquando realização das extrações. Após o procedimento, devem ser executadas radiografias a toda a cavidade oral para assegurar que todos os fragmentos de raízes não absorvidas foram extraídos (Cannon 2015, Mestrinho et al. 2015). Estudos apoiam que a extensão das extrações (total ou parcial) não pareceram influenciar o prognóstico (Winer et al. 2016, Reiter et al. 2019, Lee et al. 2020).

Posteriormente à cirurgia, antibioterapia e analgesia devem ser mantidas até os locais de extração sararem. A metadona e a morfina são fortes analgésicos para o período pré e pós-operatório (Reiter et al. 2019). Buprenorfina é um dos analgésicos de eleição para dor moderada a muito grave, em conjunto com AINEs como o Meloxicam, ou quando estes são contraindicados (Cannon 2015, Reiter et al. 2019). Também deve ser considerada a necessidade de suporte nutricional em casa com comida mais palatável nos primeiros dias ou, em casos mais graves, a colocação de um tubo de esofagostomia para assegurar a ingestão de alimento e fluidos (Reiter et al. 2019).

Em casa, é necessária higiene oral diária, seja com aplicação de um agente antisséptico após as extrações dentárias, seja através de escovagem diária dos dentes que permaneceram (Cannon 2015). Esta última é, infelizmente, pouco tolerada pelos gatos. As preparações tópicas em gel ou em spray de clorexidina e dietas dentárias também fornecem um bom controlo da carga bacteriana e inflamação. As pastas podem ser colocadas no interior dos lábios, ou mesmo escovadas se o gato o permitir (Reiter et al. 2019).

Por vezes é necessário recorrer a destartarização e polimento regulares, de 6 a 12 meses. Contudo, se os sinais persistirem, geralmente o tratamento médico e a profilaxia caseira não são suficientes e é necessário recorrer à extração dos restantes dentes, onde



surgiram novas lesões. Apesar das extrações dentárias, em bastantes casos, os sinais clínicos persistem e é necessário complementar o tratamento com manejo médico (Cannon 2015).

#### **1.4.2. Tratamento médico**

O tratamento médico da GECF baseia-se em imunossupressão ou imunomodulação. Em alguns casos, a terapêutica médica é necessária até ao fim da vida (Lee et al. 2020).

Os anti-inflamatórios não esteroides, como meloxicam, ajudam a reduzir a dor oral e a manter a qualidade de vida em casos refratários e podem ser usados de forma intermitente ou a longo prazo (Cannon 2015). No entanto, um dos autores de Reiter et al. (2019) apoia que não fornecem redução da dor e da inflamação suficiente para justificar a sua utilização única como tratamento.

Os corticosteroides, nomeadamente prednisolona, são usados como tratamento sintomático a curto prazo para controlar a inflamação e os sinais clínicos. No entanto, há casos em que é necessário aumentar gradualmente a dose para atingir estabilidade clínica. Sempre que possível, deve ser evitado o seu uso a longo prazo devido aos efeitos secundários da sua administração contínua, como diabetes mellitus, ganho de peso, (Cannon 2015, Lee et al. 2020), poliúria e polidipsia, alterações dermatológicas, entre outros (Lommer 2013). Nos gatos, dá-se preferência à administração oral de corticosteroides comparativamente a injeções de longa ação, uma vez que permite prever melhor a duração do seu efeito e reduzir a dose para a mínima eficaz. Nos casos em que todos os outros tratamentos não se mostraram suficientes, os corticosteroides são úteis para prevenir sinais recorrentes (Cannon 2015).

Num estudo de Harley et al. (2003) foi demonstrado que metilprednisolona reduz significativamente os níveis de IgG após três meses de tratamento, comparativamente a antibióticos como o metronidazol e a espiramicina.

A antibioterapia não é a primeira linha de tratamento da GECF, no entanto, à semelhança do mencionado período pré-cirúrgico, antibióticos de largo-espectro como clindamicina, amoxicilina, doxiciclina ou o metronidazol, entre outros, devem ser considerados, idealmente com base numa cultura bacteriana e teste de sensibilidade a antibióticos (Cannon 2015, Hussain et al. 2021). A halitose e a piorreia podem ser indicadores da necessidade de antibioterapia, uma vez que está frequentemente associada a infeção bacteriana (Cannon 2015).

O Interferão Recombinante Ómega Felino (rFeIFN-u) pode também ser usado para controlo dos sinais clínicos de GECF. O Interferão é uma proteína sinalizadora que interfere

com a replicação viral, exibindo a sua atividade antiviral contra FHV-1, FCV, coronavírus felino, FIV e FeLV. Atualmente, o rFeIFN-u é comercializado para infeções por parvovírus canino, FIV e FeLV (Lee et al. 2020). A administração pode ser oral, no entanto, apesar de ser o método mais barato, nem sempre é eficaz. Em casos graves, ou quando a administração *per os* não levou à resolução da doença, pode ser administrado por via subcutânea. A administração intralesional é uma alternativa menos usada, no entanto, em casos bastante graves, é sugerida (Reiter et al. 2019). rFeIFN-u foi administrado oralmente durante 3 meses e observou-se melhorias substanciais em 45% dos gatos, dos quais 10% atingiram remissão clínica, no entanto, não se provaram resultados estatisticamente significativos (Hennet et al. 2011).

A ciclosporina é uma das alternativas imunossupressoras para o tratamento de GECF. É um péptido lipofílico derivado de fungos usado em medicina humana e veterinária (Lommer 2013). Reduz a expressão da interleucina 2 (IL-2), uma citocina pró-inflamatória responsável por aumentar o número de células T e, conseqüentemente, a ciclosporina inibe a ativação das mesmas. Numa escala menor, os seus efeitos também se observam em células B (Lommer 2013, Lee et al. 2020). Um ensaio duplamente cego, que administrou ciclosporina a gatos já submetidos a extrações dentárias, observou uma melhoria clínica significativa entre o grupo tratado com ciclosporina comparativamente com um grupo placebo. Neste estudo mostrou-se, ainda, que níveis de ciclosporina sérica acima de 300 ng/mL estavam associados a melhorias significativas (Lommer 2013). No entanto, a redução do apetite e a perda de peso são efeitos adversos comuns que devem ser monitorizados (Cannon 2015).

O recurso a células estaminais mesenquimatosas (MSCs) baseia-se, principalmente, na imunomodulação. Estas são células estaminais fibroelásticas multipotentes (Febre et al. 2018) que se podem encontrar em vários tecidos como gordura e medula óssea (Reiter et al. 2019). Inibem a proliferação de células T, alteram a função das células B, desregulam o complexo de histocompatibilidade II em células apresentadoras de antígenos, e inibem a maturação e diferenciação das células dendríticas (Febre et al. 2018, Reiter et al. 2019). MSCs placentárias são uma alternativa promissora para o tratamento de doenças inflamatórias, uma vez que mostraram ter propriedades imunomoduladoras maiores do que MSCs adultas (Febre et al. 2018). Nalguns estudos focaram-se no uso de células estaminais mesenquimatosas do tecido adiposo autólogas e alogénicas. O tratamento com células autólogas resultou numa resposta positiva de 71,4%, nos quais 42,8% apresentaram remissão clínica (Febre et al. 2018, Lee et al. 2020). Um estudo que examinou a eficácia de células alogénicas mostrou uma remissão clínica de 28,6% e melhoria significativa em 28,6%, o que resultou numa menor eficácia clínica com uma resolução histológica e clínica mais tardia, comparativamente a células estaminais mesenquimatosas autólogas (Lee et al. 2020). Independentemente da

origem celular, concluiu-se que a administração sistêmica de células mesenquimatosas de origem adiposa permite reduzir significativamente a inflamação oral em gatos com GECF (Arzi et al. 2020).

Sendo a GECF uma doença muito dolorosa, todo o tratamento deve ter em conta um manejo da dor adequado. Essa terapia depende de vários fatores como a existência de doenças concomitantes como doença renal ou hepática, medicações que estejam a ser administradas, o temperamento do animal, e a percepção da dor oral. Usualmente, a longo prazo, são administrados opioides, como a buprenorfina, associados a gabapentina (Lee et al. 2020).

Assim, para melhorar a qualidade de vida dos pacientes que sofrem de GECF, é essencial uma combinação de boa higiene oral, extrações dentárias parciais ou totais, e um tratamento médico complementar adequado (Hussain et al. 2021).

## **2. Resposta inflamatória**

Quando a saúde de um animal é desafiada, ou por uma ameaça interna ou por uma ameaça externa, constrói-se uma resposta forte que leva à ativação do sistema imunitário inato e adquirido, sendo o sistema imunitário inato aquele que cobre os mecanismos não dependentes de uma resposta específica (Jain et al. 2011). Perante condições inflamatórias agudas e crônicas, como processos infecciosos, traumáticos, neoplásicos e imunomediados, que desregulam a homeostase do organismo, este desenvolve uma reação sistêmica rápida, complexa e inespecífica, denominada resposta de fase aguda (APR – *acute phase response*) (Kann et al. 2012, Winkel et al. 2015).

A APR faz parte do sistema imunitário inato, e descreve uma série de eventos responsáveis pela sobrevivência do organismo durante a fase inicial da exposição dos animais a estímulos potencialmente patogénicos (Cerón et al. 2005, Paltrinieri 2008). A APR é uma resposta muito rápida que, por vezes, precede o aparecimento de sinais clínicos, o que a torna um dos primeiros marcadores para o aparecimento de processos patológicos (Cerón et al. 2005). Com o objetivo de reduzir a lesão tecidual e restabelecer a homeostase (Cray et al. 2009, Rosa and Mestrinho 2019), a APR é caracterizada por vários eventos fisiopatológicos, nomeadamente febre, leucocitose, e alteração da concentração de proteínas plasmáticas conhecidas por proteínas de fase aguda (PFA) (Paltrinieri 2008, Jain et al. 2011, Rosa and Mestrinho 2019, Bazzano et al. 2022). Outras alterações como o aumento do cortisol sérico, a diminuição da tiroxina, de ferro e de zinco e alterações metabólicas como lipólise, gliconeogénese e catabolismo muscular também são observadas (Cerón et al. 2005, Rosa and Mestrinho 2019). A APR inicia-se nos locais lesionados, onde macrófagos, alguns neutrófilos (Paltrinieri 2008) e monócitos (Jain et al. 2011) produzem e libertam citocinas pró-

inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1), a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (Paltrinieri 2008, Jain et al. 2011, Winkel et al. 2015). Quando a produção de citocinas locais é amplificada, esta provoca um aumento das citocinas correspondentes na corrente sanguínea e observa-se então uma APR sistémica (Ehltling et al. 2021). As citocinas são então responsáveis pelos sinais clínicos comuns de inflamação sistémica: febre, letargia e anorexia (Paltrinieri 2008, Rossi 2023). A expressão destes mediadores permite uma comunicação entre células parenquimatosas do fígado, nomeadamente os hepatócitos, e células não parenquimatosas, como as células de Kupffer (Ehltling et al. 2021). Após estimulação por citocinas pró-inflamatórias, as células de Kupffer no fígado produzem IL-6 e apresentam-na aos hepatócitos, o que inicia a produção de PFA por parte dos mesmos e a sua libertação na corrente sanguínea. Concluiu-se que IL-6 é um dos maiores mediadores da produção hepática destas proteínas (Jain et al. 2011).

### **2.1. Proteínas de fase aguda (PFA)**

As proteínas de fase aguda são proteínas plasmáticas que alteram a sua concentração sérica em mais de 25% após estimulação por citocinas pró-inflamatórias. Desta forma, podem ser usadas para avaliar a resposta imunitária sistémica a uma lesão (Eckersall and Bell 2010). São agrupadas por PFA positivas, cuja concentração aumenta aquando da APR, por exemplo, proteína C reativa (CRP), proteína amilóide sérica A (SAA), haptoglobina, alfa-1 glicoproteína ácida (AGP) (Kajikawa et al. 1999, Cerón et al. 2005), ou PFA negativas, cuja concentração diminui, por exemplo, albumina, transferrina (Cerón et al. 2005, Cray et al. 2009) e paraoxonase-1 (Rossi et al. 2020). As PFA positivas são divididas em duas classes, consoante a sua resposta às citocinas. As PFA positivas do tipo 1, nomeadamente AGP, SAA, CRP e haptoglobina, são reguladas por IL-1, IL-6 e glucocorticoides. As PFA positivas do tipo 2, que incluem as três cadeias de fibrinogénio e várias protéases inibidoras, são reguladas por IL-6 e glucocorticoides (Fournier et al. 2000). Consoante a magnitude e duração da sua resposta em relação a um estímulo, PFA são ainda classificadas como maiores, moderadas ou menores (Paltrinieri 2008, Kann et al. 2012, Bazzano et al. 2022). As PFA maiores aumentam a sua concentração de 10 a 1000 vezes em humanos e 10 a 100 vezes em animais domésticos, como se observa na CRP e na SAA. As PFA moderadas demonstram um aumento de 2 a 10 vezes, como a haptoglobina e outras alfa-globulinas (Kann et al. 2012). As PFA menores demonstram um aumento muito pouco significativo, inferior a 2 vezes (Paltrinieri 2008). No entanto, a sua síntese, secreção e excreção varia consoante as diferentes espécies de animais (Tuna and Ulutas 2022). Em cães, observa-se uma resposta forte da CRP, contrariamente ao que se observa em gatos (Cerón et al. 2005). Os gatos possuem a SAA como a sua maior PFA (Paltrinieri 2008, Kann et al. 2012, Rosa and Mestrinho

2019, Bazzano et al. 2022) e muito pouca alteração da CRP (Jain et al. 2011, Kann et al. 2012).

A concentração das PFA positivas começa a aumentar poucas horas após o estímulo lesional, atingindo o seu pico entre as 24h e as 48h, mantendo-se elevadas enquanto o estímulo inflamatório persiste (Paltrinieri 2008, Bazzano et al. 2022). Uma vez que não estão armazenadas em nenhum tecido, a sua concentração reduz rapidamente aquando da redução do estímulo e da recuperação, sendo as PFA maiores as mais rápidas a diminuir devido à sua curta semivida (Rossi 2023). Quando uma série de estímulos inflamatórios consecutivos ocorre, a APR pode tornar-se crónica e as concentrações das PFA mantêm-se elevadas, embora numa magnitude inferior ao observado num episódio agudo (Jain et al. 2011).

Os hepatócitos são a principal origem das PFA. No entanto, não são o seu único local de produção (Ehltling et al. 2021). Os linfócitos mostraram produzir AGP e, em diferentes espécies animais, a produção de SAA também foi observada no rim, intestino, medula óssea, adipócitos e glândula mamária (Cerón et al. 2005).

### **2.1.1. Funções das PFA**

O papel fisiológico destas proteínas ainda não é completamente conhecido (Cerón et al. 2005), sendo que cada PFA tem diversas funções (Paltrinieri 2008). Sabe-se que as principais funções se baseiam em defender o organismo durante a inflamação, ao modular a eficiência do sistema imunitário, ao transportar moléculas para prevenir a sua perda, e ao proteger os tecidos de lesões causadas por mediadores inflamatórios (Paltrinieri 2008, Cray et al. 2009). Algumas PFA, individualmente, possuem tanto um efeito anti-inflamatório como um efeito pró-inflamatório que, para promover a homeostase, devem encontrar-se em equilíbrio (Cerón et al. 2005, Rosa and Mestrinho 2019).

Nos gatos, o aumento da concentração de SAA, AGP e haptoglobina está associada a várias condições patológicas (Kajikawa et al. 1999, Kann et al. 2012), nomeadamente a doenças endócrinas, infecciosas, neoplásicas, feridas, hospitalização, insuficiência renal e cirurgia (Kann et al. 2012, Rossi 2023), e são indicadores úteis para monitorizar a resposta inflamatória (Rosa and Mestrinho 2019). Nesta espécie, SAA é a mais rápida a aumentar a sua concentração em resposta a um estímulo (Kajikawa et al. 1999), com um aumento de 10 a 50 vezes durante a inflamação (Paltrinieri 2008). A AGP é uma PFA moderada, com aumento de 5 a 10 vezes (Rossi et al. 2020), em conjunto com a haptoglobina. A AGP é altamente específica para diagnóstico de Peritonite Infecciosa Felina (PIF) (Rossi 2023) e, combinada com a SAA, são usadas para monitorizar esta doença e linfoma (Mestrinho et al. 2020). Num estudo de Winkel et al. (2015), observou-se uma diminuição das concentrações plasmáticas de SAA e AGP em gatos que atingiram a remissão de linfoma para níveis

semelhantes às de gatos saudáveis usados como controlo, podendo estas proteínas tornar-se um potencial marcador do efeito do tratamento antineoplásico de gatos com linfoma.

### 2.1.2. PFA como diagnóstico

Tanto para medicina humana como para medicina veterinária, tem sido um desafio descobrir novos biomarcadores que identifiquem, de uma forma precoce, doenças subclínicas (Bazzano et al. 2022). As PFA podem ser usadas como biomarcadores no diagnóstico, prognóstico e na monitorização da resposta à terapia. No entanto, embora possuam elevada sensibilidade para a inflamação, têm uma grande variabilidade entre espécies e uma especificidade baixa (Eckersall and Bell 2010), uma vez que alterações na sua concentração ocorrem na presença de inflamação independentemente do agente causador da doença (excetuando a AGP para o diagnóstico de PIF) (Paltrinieri 2008, Rossi 2023). Concluiu-se então que a medição da concentração das PFA é útil para a deteção precoce de doenças subclínicas (Cerón et al. 2005), embora não forneçam um diagnóstico específico para a causa subjacente (Kann et al. 2012).

Uma vez que as PFA respondem de forma muito variável à inflamação e à lesão tecidual, pressupõe-se que a medição de um conjunto de diferentes PFA é mais útil do que a avaliação de uma proteína isolada. Idealmente, deveria ser realizado um perfil com uma PFA maior, uma moderada e uma negativa (Cerón et al. 2005, Kann et al. 2012). Em medicina humana e veterinária, tem sido usado um índice de fase aguda que combina várias PFA numa formulação matemática (Gruys et al. 2006) (Equação 1). Em gatos, SAA é a melhor PFA candidata à PFA positiva rápida, AGP à PFA positiva lenta, e albumina à PFA negativa lenta. Outras PFA negativas podem ser boas opções, nomeadamente paraoxonase-1, no entanto, devido à falta de conhecimento acerca da farmacocinética das mesmas, a distinção entre rápidas e lentas ainda não foi descrita. Este index permitirá aumentar consideravelmente a capacidade de deteção de inflamação por parte das PFA (Rossi 2023), no entanto, algumas limitações opõem-se ao seu uso recorrente em medicina veterinária, uma vez que existem poucos kits de ensaio disponíveis no mercado, estes apresentam um custo bastante elevado (Kann et al. 2012), e são necessárias tecnologias diferentes para quantificar cada PFA (Rossi 2023).

$$\text{índice} = \frac{(\text{concentração da uma PFA positiva rápida}) \times (\text{concentração da uma PFA positiva lenta})}{(\text{concentração da uma PFA negativa rápida}) \times (\text{concentração da uma PFA negativa lenta})}$$

**Equação 1 - Índice de fase aguda numa formulação matemática (adaptado de Gruys et al. 2006).**

### **2.1.3. Métodos de doseamento de PFA**

Existem vários métodos disponíveis para a medição de PFA específicas, no entanto, a maioria dos métodos é muito demorado e caro, o que limita o uso das PFA como uma prática recorrente (Paltrinieri 2008). Devido ao uso de diferentes metodologias e à falta de material para estandardizar os ensaios, tem-se observado discrepâncias elevadas entre as concentrações de PFA de gatos saudáveis realizadas em vários estudos (Kann et al. 2012). Atualmente, PFA podem ser determinadas por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), Radioimunoensaio, Nefelometria (Paltrinieri 2008), Imunoturbidimetria, Western Blot, análise do RNA mensageiro e Eletroforese em Gel de Agarose (AGE), em Acetato de Celulose (CAE) e capilar (CZE) (Moore and Avery 2019).

### **2.1.4. Albumina**

#### **2.1.4.1. Albumina e a sua estrutura**

A albumina é uma PFA negativa presente na maioria das espécies (Jain et al. 2011), cuja concentração diminui durante a APR, e o pool de aminoácidos não usados para a sua produção é desviado para a produção de PFA positivas (Paltrinieri 2008, Cray et al. 2009).

É a proteína plasmática mais abundante de cães e gatos, constituindo 35-50% da proteína presente no plasma (Cerón et al. 2005). Contém uma cadeia peptídica de 580 a 585 aminoácidos, dependendo da espécie (Schreiber 1988), e um peso molecular de 66 kDa (Roche et al. 2008). É uma proteína altamente solúvel, com uma semivida de cerca de 20 dias (Roche et al. 2008, Sheinenzon et al. 2021), cuja sua concentração plasmática representa o equilíbrio entre a sua síntese hepática, o seu catabolismo, e o seu transporte transciliar (Roche et al. 2008). O seu ponto isoelétrico (PI) encontra-se entre 4,8 e 5,2, dependendo das moléculas a que a albumina se liga (Schreiber 1988).

Em circunstâncias normais, a pressão oncótica sanguínea é o regulador fisiológico da síntese de albumina (Schreiber 1988), uma vez que a concentração da mesma é detetada por osmorreceptores no interstício hepático (De Simone et al. 2021).

A hipoalbuminémia (valores de albumina inferiores a 3,5 g/dL) é causada, frequentemente, por doença hepática crónica, que leva a morte das células do fígado e consequente diminuição da produção de albumina (Sheinenzon et al. 2021). No entanto, pode-se observar uma redução da sua síntese devido a diversos outros fatores (Mitchell et al. 2009). O stress por traumatismo, infeção, radiação, cirurgia e, especialmente, queimaduras, está associado a uma redução na concentração de albumina. Pensa-se que má-nutrição seja um dos maiores fatores de hipoalbuminémia, apoiado pela sua diminuição aquando da redução de ingestão de comida. As alterações gastrointestinais também levam a

hipoalbuminemia, provavelmente devido a perda intestinal de proteínas plasmáticas a um nível demasiado elevado para conseguir ser compensado pela sua síntese (Schreiber 1988). Em quase todas as espécies animais, durante a APR, observa-se uma diminuição da concentração sanguínea de albumina resultante de uma perda seletiva por parte de alterações gastrointestinais e renais, ou por redução da sua síntese hepática (Cray et al. 2009). Ainda não foi provado se esta diminuição se deve a uma extravasão dos vasos para os tecidos inflamados (Paltrinieri 2008), no entanto, inflamação aumenta a permeabilidade vascular através de neutrófilos, o que sugere a possibilidade da deslocação de albumina para os locais lesionados para exercer o seu papel antioxidante (Roche et al. 2008).

Várias hormonas como cortisol, hormonas da tiroide, hormona do crescimento e insulina mostraram estimular a síntese de albumina (Schreiber 1988).

#### **2.1.4.2. Funções da albumina**

A albumina é responsável por cerca de 75% da pressão osmótica plasmática e é a maior fonte de aminoácidos a serem utilizados pelo animal (Cerón et al. 2005). Esta PFA negativa tem duas funções principais: a manutenção da pressão osmótica e o transporte de várias substâncias (Schreiber 1988).

A albumina sérica é o determinante principal da pressão oncótica e da distribuição de fluidos entre os vários compartimentos corporais (Roche et al. 2008, De Simone et al. 2021). Perante um aumento de globulinas séricas ou de outros colóides plasmáticos, a albumina diminui a sua concentração de forma a manter uma pressão oncótica eficaz no espaço vascular, tanto através da redução da sua síntese, como com o aumento da sua degradação e albuminúria (Schreiber 1988).

A albumina é denominada de “esponja” da circulação uma vez que se liga a várias moléculas endógenas e exógenas (Roche et al. 2008), nomeadamente metais, ácidos gordos, colesterol, pigmentos biliares, hormonas, fármacos e toxinas (Schreiber 1988, Roche et al. 2008, De Simone et al. 2021). Desta forma, tem uma elevada influência na farmacocinética e farmacodinâmica de fármacos, nomeadamente anticoagulantes, antibióticos, AINEs, entre outros, e na destoxificação do plasma de tóxicos como agentes organofosforados (inseticidas, pesticidas) (De Simone et al. 2021). Transporta componentes essenciais na corrente sanguínea, como a bilirrubina, ácidos gordos e hormonas, para os órgãos (Sheinenzon et al. 2021). Transporta também espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio resultantes do metabolismo celular, funcionando como antioxidante (Roche et al. 2008). Estes produtos têm a capacidade de promover lesões oxidativas, inflamação, disfunção endotelial e fibrose de tecido renal. A albumina exerce mais de 80% da atividade de captura de radicais livres no soro, sendo assim o antioxidante predominante do organismo (De Simone et al. 2021).



Para além destas atividades, esta proteína tem também algum papel na regulação do equilíbrio ácido-base, na inibição da função plaquetária, e na permeabilidade vascular (Sheinenzon et al. 2021).

A medição da albumina, geralmente, é uma prática rotineira por métodos de espectrofotometria, nomeadamente o Verde de Bromocresol (Cerón et al. 2005).

### **2.1.5. Alfa-1 glicoproteína ácida (AGP)**

#### **2.1.5.1. AGP e a sua estrutura**

A alfa-1 glicoproteína ácida (AGP), também denominada de orosomucóide, é uma PFA positiva pertencente à família lipocalina, um grupo de proteínas que se liga e transporta moléculas hidrofóbicas (Paltrinieri 2008). É uma proteína com solubilidade bastante elevada, que possui uma cadeia peptídica de 183 aminoácidos, um pH muito baixo de 2,8 a 3,8 (Fournier et al. 2000) devido à presença de ácidos siálicos (Hochepped et al. 2003), um peso molecular de 43 kDa, e um conteúdo bastante elevado em carboidratos, cerca de 45% (Fournier et al. 2000, Cerón et al. 2005). É altamente glicosada, sendo a principal proteína componente do seromucóide - a fração do plasma mais resistente à precipitação ácida (Cerón et al. 2005). Existem duas formas diferentes de AGP. A primeira forma é produzida por linfócitos e tem um peso molecular de 54 kDa aproximadamente, a segunda forma é a orosomucóide observada no soro com cerca de 40 kDa de peso molecular, provavelmente resultante da clivagem de resíduos de ácido siálico da primeira forma (Selting et al. 2000). Os processos inflamatórios agudos e as condições fisiopatológicas tais como gravidez, artrite reumatoide grave, cirrose e hepatite podem alterar a glicosilação, podendo encontrar-se diferentes tipos de AGP séricos, dependendo do tipo de glicosilação e das substituições de aminoácidos (Fournier et al. 2000).

A AGP é produzida maioritariamente por hepatócitos e linfócitos em resposta a citocinas, nomeadamente IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (Selting et al. 2000), e glucocorticoides (Fournier et al. 2000). A sua produção por parte de linfócitos corrobora a sua elevada concentração em cães e gatos com linfoma (Céron et al. 2005). Através do isolamento de hepatócitos humanos, foi demonstrado que IL-8 também estimula a produção de AGP. Em ratos, glucocorticoides mostraram estimular bastante a produção de AGP na ausência de citocinas, enquanto a hormona de crescimento inibe a síntese da mesma. Em cães e ratos, comprovou-se que fenobarbital estimula a síntese de AGP, atuando diretamente nos hepatócitos (Fournier et al. 2000).

Nos gatos, a AGP é uma das principais PFA, em conjunto com a SAA, e a sua concentração aumenta rapidamente aquando de lesões teciduais como inflamação,

traumatismo, stress excessivo, neoplasia (linfoma) ou doenças infecciosas (PIF e FIV) (Correa et al. 2001, Thalmeier et al. 2023). No entanto, as suas concentrações não se mostraram relevantes para avaliar o prognóstico de gatos em tratamento com linfoma (Correa et al. 2001). A maioria dos estudos de AGP em felinos tem-se focado na sua concentração sérica e tecidual em gatos infetados com PIF (Paltrinieri 2008). Nos cães com anemia hemolítica imunomediada observou-se uma concentração maior da AGP em comparação com cães saudáveis, e a sua redução com o tratamento (Mitchell et al. 2009). Nos cães com linfoma, vários carcinomas e sarcomas, também se observou o aumento desta proteína. Na monitorização de cães com linfoma, a AGP reduziu significativamente com a remissão completa após tratamento, comparativamente ao início do tratamento (Correa et al. 2001), e voltou a aumentar antes da recidiva (Cerón et al. 2005).

#### **2.1.5.2. Funções da AGP**

As funções da AGP são influenciadas por modificações moleculares (Ehltling et al. 2021), apresentando, por vezes, ações contraditórias que dependem de vários fatores, como o tipo de células com que a AGP interage, a glicosilação, e a concentração da AGP, uma vez que concentrações baixas e altas podem ter efeitos opostos (Hochepped et al. 2003).

A AGP modula a resposta inflamatória e imunitária (Hochepped et al. 2003). Esta tanto induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-12, (Ehltling et al. 2021) como exibe efeitos anti-inflamatórios através da indução da secreção de antagonistas dos recetores de IL-1 e TNF- $\alpha$ , redução da ação neutrofílica (fagocitose, migração, entre outros), inibição da proliferação de linfócitos (Paltrinieri 2008, Ehltling et al. 2021), e inibição da agregação plaquetária (Selting et al. 2000, Paltrinieri 2008, Mestrinho et al. 2020). Estas funções contrárias devem-se aos diferentes padrões de glicosilação (Selting et al. 2000, Hochepped et al. 2003, Ehltling et al. 2021). A AGP consegue também interagir com a permeabilidade seletiva capilar do endotélio e atrasar a extravasão, preservando a perfusão e função orgânica e prevenindo a invasão bacteriana para a corrente sanguínea e órgãos (Hochepped et al. 2003).

Por fim, a AGP liga-se a várias moléculas e fármacos (Fournier et al. 2000, Hochepped et al. 2003). Transporta pequenas moléculas hidrofóbicas e liga-se a proteínas e mediadores plasmáticos, acompanhando a regulação da defesa inata (Mestrinho et al. 2020). Ao unir-se a vários fármacos endógenos e exógenos (Hochepped et al. 2003), pode reduzir a quantidade de fármacos livres no sangue e, desta forma, influenciar a farmacocinética e farmacodinâmica dos mesmos (Selting et al. 2000), à semelhança do que é observado com a albumina.

Tanto no soro como no líquido peritoneal, a AGP é um biomarcador reconhecido de PIF (Eckersall and Bell 2010), uma doença felina letal causada por coronavírus, cuja

concentração de AGP aumenta na sua presença (Paltrinieri et al. 2007). Embora o aumento da concentração de PFA não seja capaz de distinguir diferentes processos patológicos, valores serológicos de AGP superiores a 1,5 g/dL apresentam uma sensibilidade de 85% e uma especificidade de 100% para distinguir PIF de outras condições com apresentações clínicas semelhantes (Rossi 2023).

Um estudo de Mestrinho et al. (2020) testou a hipótese de que GECF estaria associada a um estado inflamatório sistémico e que, após extrações dentárias, esta inflamação reduziria significativamente. Os resultados confirmaram que os valores de AGP se apresentavam significativamente elevados em gatos com GECF, comparativamente a animais saudáveis usados como controlo, mas não se verificou redução dos mesmos 60 dias após o tratamento com extrações dentárias.

## **2.1.6. Proteína amilóide sérica A (SAA)**

### **2.1.6.1. SAA e a sua estrutura**

A SAA é uma PFA positiva, cuja concentração pode aumentar até 1000 vezes superior aos seus valores normais (Tamamoto et al. 2013). Possui um peso molecular de 15 kDa e é uma apolipoproteína hidrofóbica (Cerón et al. 2005), muito pouco solúvel em soluções aquosas. No sangue, a SAA está associada a lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Gollaher and Bausserman 1990, Sack 2018), sendo que cerca de 95% da SAA circulante encontra-se na fração HDL. Está então envolvida no metabolismo do colesterol tanto em condições fisiológicas como inflamatórias (Sack 2018). Pensa-se que a SAA seja o precursor da proteína amilóide A, podendo estar envolvida na patogenia da amiloidose e outras doenças inflamatórias crónicas (Cerón et al. 2005).

A SAA aparenta estar associada à patogenia da amiloidose AA (Kisilevsky and Manley 2012), uma vez que inflamação crónica pode estar associada a valores persistentemente aumentados de SAA e, conseqüentemente, levar a amiloidose secundária (Sack 2018). A SAA sofre clivagem proteolítica e origina a proteína fibrilar amilóide A (AA) (Gollaher and Bausserman 1990), que se irá depositar em vários órgãos, nomeadamente no fígado, baço e rim. Esta doença ocorre principalmente em raças predispostas como gatos Siameses e Abissínios, e é despoletada por doenças inflamatórias crónicas como enteropatia crónica e gengivoestomatite crónica felina. O órgão que sofre mais deposição em gatos é o baço, no entanto, a causa principal de morte mostrou-se ser insuficiência renal por deposição de proteína fibrilar amilóide A em várias zonas do rim (Ferri et al. 2023).

Uma vez que aumenta rapidamente durante a APR, a SAA é considerada um indicador sensível de inflamação em espécies domésticas (Escribano et al. 2021, Bazzano et al. 2022, Rossi 2023), sendo a maior PFA em gatos pela sua rápida e elevada resposta em doenças imunomediadas, inflamatórias, infecciosas e neoplásicas (Yuki et al. 2020, Escribano et al. 2021, Rossi 2023). Contrariamente a outros estudos, Yuki et al. (2020) mostrou que não havia alterações significativas da SAA em gatos com hipertiroidismo e Diabetes mellitus, comparativamente a gatos saudáveis. Existem variadas razões para estas discrepâncias, nomeadamente a diferente amostragem entre os estudos e as diferentes metodologias usadas para a quantificação de SAA, que levam a diferentes sensibilidades (Rossi 2023). Um estudo de Naidenko et al. (2022) demonstrou também o aumento desta PFA em gatas grávidas, principalmente nos momentos de maior lesão tecidual, como o parto.

O aumento de SAA em gatos é inferior ao observado em humanos, cerca de 10-50 vezes e mais de 100, respetivamente (Paltrinieri 2008), e, se a lesão for resolvida, os seus valores reduzem para valores normais após 7 a 10 dias (Kisilevsky and Manley 2012). Os valores maiores foram demonstrados em gatos com PIF (Paltrinieri 2008, Escribano et al. 2021) e com pancreatite aguda (Escribano et al. 2021). Nos cães, a concentração de SAA mostrou aumentos durante a APR por infeções por leishmaniose (Eckersall and Bell 2010), parvovírus e Bordetella bronchiseptica (Cerón et al. 2005, Eckersall and Bell 2010).

O principal local de síntese e de catabolização de SAA é no fígado (Gollaher and Bausserman 1990), no entanto, tal como se observou nas PFA anteriores, a sua síntese também foi comprovada noutros tecidos como macrófagos, pulmão (Sack 2018), rim, intestino, medula óssea, adipócitos em casos de hiperglicemia, e glândula mamária em casos de mastite (Cerón et al. 2005).

#### **2.1.6.2. Funções da SAA**

O papel biológico da SAA ainda é pouco compreendido, no entanto, esta proteína aparenta ter propriedades protetoras e imunomoduladoras (Troia et al. 2017). Tal como se observou no caso da AGP, a SAA possui efeitos anti e pró-inflamatórios durante a APR. A sua capacidade pró-inflamatória baseia-se na sua capacidade de se ligar ao HDL no plasma e reduzir assim a sua capacidade anti-inflamatória e antioxidante, e na capacidade de promover o recrutamento de neutrófilos e células mononucleares que libertam colagenases e oxidases e expressam mediadores pró-inflamatórios capazes de lesionar os tecidos. Acerca das suas propriedades protetoras, a SAA possui efeitos antifúngicos e antivíricos, inativa toxinas bacterianas e induz a proliferação de células T reguladoras (Ehltling et al. 2021).

A SAA também exerce funções na reciclagem do colesterol de células lesionadas. Durante a APR, macrófagos fagocitam detritos celulares ricos em colesterol e aumentam os

locais de ligação ao complexo SAA/HDL. Quando SAA é sintetizada e associada ao HDL, liga-se aos macrófagos e separa-se do HDL. Desta forma, o colesterol é exportado para o HDL e redistribuído para sistemas que o necessitem ou excretem (Kisilevsky and Manley 2012).

A concentração de SAA tem um valor de prognóstico promissor, uma vez que permite detetar doenças inflamatórias não controladas (Tamamoto et al. 2013, Troia et al. 2017), no entanto, o seu uso em medicina veterinária está bastante limitado pelas dificuldades na purificação e quantificação da mesma, provavelmente devido às suas características hidrofóbicas e de associação ao HDL (Cerón et al. 2005). Tal como foi mencionado acerca da AGP, os métodos de avaliação de SAA também são bastante dispendiosos e demorados, impossibilitando o seu uso como uma prática de rotina (Bazzano et al. 2022).

### **3. Canabidiol (CBD)**

#### **3.1. Caracterização**

A planta *Cannabis sativa*, conhecida por canábis ou cânhamo, possui múltiplos compostos químicos, nomeadamente fitocanabinoides, terpenoides, flavonoides e esteróis (Deabold et al. 2019). Os canabinoides constituem mais de 100 dos compostos da planta, e partilham uma estrutura química semelhante (Crippa et al. 2018). Dentro destes, o tetrahydrocanabidiol (THC), o canabidiol (CBD), e o ácido que dele deriva – o ácido canabidiólico (CBDA) - que se converte rapidamente em CBD com o calor e alterações de pH, são os componentes encontrados em concentrações mais elevadas (Deabold et al. 2019, Mlost et al. 2020). O THC é o principal composto responsável pelos efeitos psicoativos da planta canábis (Crippa et al. 2018, Fraguas-Sánchez and Torres-Suárez 2018, Yu and Rupasinghe 2021), um lípido supostamente envolvido na defesa da planta contra predadores, luz ultravioleta e stress ambiental (De Briyne et al. 2021), ao contrário do CBD, um composto não psicotrópico (Fraguas-Sánchez and Torres-Suárez 2018, Miranda-Cortés et al. 2023) que não produz os efeitos típicos do consumo de canábis (Crippa et al. 2018). A concentração de CBD em *Cannabis sativa* é muito variável, dependendo da idade da planta (De Briyne et al. 2021), das condições do seu crescimento, dos diferentes fenótipos e da parte da planta que é analisada, podendo constituir até 40% dos extratos da planta (Machado et al. 2011).

O uso de canábis e produtos derivados da mesma tem vindo a aumentar globalmente (De Briyne et al. 2021). Fundamentos éticos e legais tornam o seu uso controverso na medicina humana e veterinária, no entanto, os seus benefícios terapêuticos têm potenciado a sua aprovação médica e têm sido usados como antiespasmódicos, antieméticos, anticonvulsivos, estimuladores de apetite, ou pelas suas propriedades neuroprotetoras, analgésicas e anti-inflamatórias, em cães, gatos e furões (Miranda-Cortés et al. 2023).

### **3.2. Legislação**

O CBD tem-se tornado cada vez mais popular devido às alterações da legislação federal (Deabold et al. 2019), tornando legal a distribuição de cânhamo e produtos à base de cânhamo nos Estados Unidos, desde que contenham menos de 0.3% de THC (Deabold et al. 2019, De Briyne et al. 2021, Corsato et al. 2023). A *Cannabis sativa* (cânhamo) e a *Cannabis indica* (marijuana) são espécies de grande proximidade (ASAE, 2021), pertencentes à família *Cannabaceae*. Estas variam apenas nos seus teores de THC (De Briyne et al. 2021), que vão desde os 0,2% a mais de 10%. Devido a esta proximidade, na União Europeia, apenas é autorizada a cultura de plantas com teor de THC até 0,2%. Os alimentos comercializados derivados da canábis têm de ser provenientes exclusivamente das sementes do cânhamo (ASAE, 2021) e de variedades de *Cannabis sativa* que contenham THC inferior a 0,2% (ASAE 2021, De Briyne et al. 2021). Segundo Infarmed (2019), toda a cadeia de produção, desde o cultivo à preparação e distribuição da planta canábis, é conhecida e controlada de forma a garantir que a produção dos produtos está de acordo com as boas práticas, garantindo a qualidade e segurança, e prevenindo o uso indevido por parte dos doentes a que têm acesso aos mesmos.

### **3.3. O Sistema Endocanabinoide (SEC)**

O sistema endocanabinoide (SEC) é uma rede complexa de sinalização endógena (Polidoro et al. 2021) presente em todos os animais vertebrados (mamíferos, aves, répteis e peixes) e invertebrados (sanguessugas, mexilhões, nematodes, entre outros) (Silver 2019). Este sistema contribui para a homeostasia de vários órgãos, estando associado a múltiplos processos fisiológicos (Polidoro et al. 2021).

O SEC é composto por três elementos principais: ligandos endógenos, recetores acoplados à proteína G, e enzimas que sintetizam, degradam e reciclam esses ligandos (Mlost et al. 2020, Polidoro et al. 2021, Miranda-Cortés et al. 2023). Os ligandos endógenos mais estudados são os endocanabinoides anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Brutlag and Hommerding 2018, Fraguas-Sánchez and Torres-Suárez 2018, Silver 2019, Mlost et al. 2020, Yu and Rupasinghe 2021). Estes são produzidos por enzimas nas membranas pós-sinápticas neuronais, através do aumento dos níveis de iões de cálcio (Yu and Rupasinghe 2021). Um mecanismo de transporte proteico transporta os endocanabinoides da membrana celular pós-sináptica até aos recetores canabinoides localizados na membrana pré-sináptica (Landa et al. 2016, Silver 2019), onde se ligam e executam várias funções neurotransmissoras como inibição da adenil ciclase, inibição dos canais de cálcio dependentes da voltagem, estimulação dos canais de potássio, e estimulação de proteínas-quinase (Brutlag and Hommerding 2018). O mesmo mecanismo de transporte

conduz os ligandos de volta à membrana pós-sináptica de forma a serem metabolizados. As enzimas FAAH (ácido gordo hidrolase) e MAGL (lipase monoacilglicerol) metabolizam a AEA e 2-AG, respetivamente (Silver 2019, Yu and Rupasinghe 2021). Outras enzimas não específicas comumente associadas a mediadores inflamatórios como lipoxigenases e cicloxigenases também exercem essa função (Mlost et al. 2020). A libertação de neurotransmissores é impedida pela inibição da entrada de cálcio intracelular por parte dos endocanabinoides. Estes têm um tempo de semivida muito curto, uma vez que são rapidamente reabsorvidos e catabolizados (Silver 2019). Os ligandos acoplam-se aos seus recetores de forma a regular e modular a nociceção, o metabolismo lipídico, e a função gastrointestinal, cardiovascular e motora (Miranda-Cortés et al. 2023). A produção de AEA e 2-AG é a primeira resposta do organismo a uma lesão tecidual. São produzidas no local da lesão, e ativam recetores endocanabinoides (CB1 e CB2) para suprimir a inflamação e/ou a sensibilização do nervo aos sinais nociceptivos. A AEA modula a dor através da inibição dos sinais nociceptivos na sinapse ao ativar os recetores CB1, e reduz a inflamação ao ativar os recetores CB2. O papel da 2-AG envolve a modulação descendente da dor durante o stress agudo (Silver 2019).

Para além dos endocanabinoides, outros mediadores exógenos conseguem modular os recetores canabinoides, nomeadamente os fitocanabinoides produzidos em grande quantidade pela planta *Cannabis sativa* (Silver 2019, Polidoro et al. 2021), principalmente o THC, o CBD e outros canabinoides sintéticos (Polidoro et al. 2021). Desta forma, o uso de canabinoides naturais ou sintéticos inibe a secreção de neurotransmissores e iões responsáveis pela modulação, projeção e perceção da dor aguda crónica e neuropática (Miranda-Cortés et al. 2023).

### **3.3.1. Recetores endocanabinoides**

Os dois tipos de recetores canabinoides primários são o CB1 e o CB2, ambos recetores acoplados a proteínas G (Rieder et al. 2010, Landa et al. 2016, Mlost et al. 2020, Miranda-Cortés et al. 2023) localizados em células pré-sinápticas (Yu and Rupasinghe 2021). Quando ativados pelos endocanabinoides, inibem a libertação de neurotransmissores como GABA e glutamato (Landa et al. 2016, Miranda-Cortés et al. 2023) e participam em vários processos biológicos, como plasticidade neuronal, dor, ansiedade, inflamação e neuro-inflamação, estimulação imunológica, regulação metabólica e crescimento ósseo (Silver 2019, Yu and Rupasinghe 2021). A estrutura dos recetores CB1 e CB2 é semelhante, embora encontrem-se em localizações anatómicas diferentes (Silver 2019). Outros recetores também estão envolvidos nos efeitos fisiológicos do CBD, como os recetores de proliferação dos peroxissomas (*peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$* ), os recetores de glicina, os

recetores vaniloides (VR1) (Fraguas-Sánchez and Torres-Suárez 2018, Greb and Puschner 2018), os recetores de serotonina 5-HT (Landa et al. 2016, Greb and Puschner 2018), entre outros.

Estudos mostraram a presença destes recetores em roedores, cães, gatos e macacos, existindo algumas diferenças quanto ao número de aminoácidos, à sua distribuição tecidual, e à sensibilidade de agonistas e antagonistas específicos (Miranda-Cortés et al. 2023).

### **3.3.1.1. CB1 e CB2**

Os recetores CB1 estão largamente distribuídos no cérebro e, desta forma, correlacionam-se com os efeitos canabinoides na cognição, apetite, emoções, memória, percepção e controlo de movimento (Brutlag and Hommerding 2018, De Briyne et al. 2021). Expressam-se no sistema nervoso central e periférico, onde regulam a libertação de neurotransmissores (Yu and Rupasinghe 2021). O sistema nervoso central (SNC) é o seu local principal, nomeadamente na medula espinhal, gânglios da base, cerebelo e córtex cerebral (Silver 2019, Miranda-Cortés et al. 2023). Predominantemente, encontram-se nas fibras pré-sinápticas, logo, agonistas de recetores CB1 apresentam maiores efeitos adversos psicoativos no SNC como hipotermia, ataxia e euforia, e um papel menor no controlo da dor. Imunohistoquímica demonstrou a sua presença no terminal axónico, e na membrana pré e pós-sináptica em astrócitos, oligodendrócitos, células da micróglia, dura mater e no córtex cerebral, relacionando-se com a memória (Miranda-Cortés et al. 2023). Em menor quantidade, distribuem-se no sistema nervoso periférico, tecido cardiovascular, gastrointestinal e reprodutivo (Silver 2019, Yu and Rupasinghe 2021). Embora a estrutura de recetores CB1 seja semelhante em todos os mamíferos (Yu and Rupasinghe 2021) estudos demonstraram variações na localização anatómica dos recetores CB1 entre espécies, nomeadamente em cães, que têm uma maior densidade destes recetores no cerebelo, comparativamente a outras espécies estudadas (De Briyne et al. 2021). Um estudo de Polidoro et al. (2021) descobriu ainda recetores CB1 distribuídos no epitélio oral de gatos saudáveis, principalmente na língua e tecidos moles da cavidade oral, sugerindo que estes recetores possam estar envolvidos na manutenção da homeostase da mucosa oral felina.

Recetores CB2 estão localizados maioritariamente em células do sistema imunitário, nomeadamente em leucócitos, baço e tonsilas (Landa et al. 2016, Silver 2019, Yu and Rupasinghe 2021) e no sistema nervoso periférico, onde exercem o seu papel na inflamação e na regulação da dor (De Briyne et al. 2021). Uma grande concentração destes recetores é encontrada em linfócitos T e B, CD4 e CD8, macrófagos, neutrófilos, mastócitos e *killer cells*. Foram ainda identificados no pâncreas, timo, pulmões, tonsilas, parótida e glândulas mandibulares, placas de Peyer, neurónios entéricos, membrana sinovial, queratinócitos



cutâneos, e em células endoteliais de vasos sanguíneos (Miranda-Cortés et al. 2023). Podem ainda ser observados no SNC em menores quantidades (De Briyne et al. 2021). A ativação seletiva destes recetores mostrou efeitos anti-inflamatórios, antinociceptivos e neuroprotetores em modelos de animais com osteoartrite, inflamação e neuropatias. Os recetores CB2 estão envolvidos em processos imunitários, inibindo a libertação de citocinas, controlando assim a dor oncológica e prevenindo a progressão destas doenças (Miranda-Cortés et al. 2023). No estudo de Polidoro et al. (2021) não foi observada expressão relevante de recetores CB2 no epitélio oral de gatos saudáveis, no entanto, em gatos com GECF, a sua distribuição foi observada em todas as camadas epiteliais e as células inflamatórias apresentaram uma expressão forte dos mesmos. Esta informação é consistente com outros estudos onde se observou uma sobreexpressão de recetores CB2 no infiltrado inflamatório subepidermal e no epitélio da pele em gatos com dermatite. Vários estudos defenderam o efeito anti-inflamatório que advém da ativação destes recetores, o que sugere o possível recurso a agonistas de CB2 para a redução de inflamação de pacientes com GECF. É então apropriado considerar o possível papel que componentes da *Cannabis sativa* podem exibir na modulação da inflamação em gatos com GECF (Polidoro et al. 2021).

O CBD e o THC mostraram interagir com ambos os tipos de recetores, no entanto, o THC tem uma afinidade particular para os recetores CB2, e o CBD tem uma menor afinidade para ambos (Miranda-Cortés et al. 2023). O THC é o único fitocanabinoide que se liga de forma ortostérica a estes recetores (Silver 2019), enquanto o CBD tem um mecanismo de ação mais complexo (Machado et al. 2011), podendo agir como um antagonista alostérico não competitivo destes recetores (Gamble et al. 2018). O CBD pode atuar como um agonista indireto de ambos os recetores, como antagonista direto do recetor CB1, ou como agonista parcial ou modulador alostérico negativo do recetor CB2. Uma vez que a ação agonista parcial depende da expressão do recetor, e da densidade e atividade tónica do sistema, a atividade do CBD pode variar consoante o tipo de tecido e as diferentes condições a que está sujeito (Mlost et al. 2020).

Alguma evidência aponta para o facto de CBD derivado da planta completa ser mais eficaz do que CBD altamente purificado ou sintetizado, o que sugere que outros canabinoides ou terpenos podem ter um efeito sinérgico ou aditivo com o de CBD (Deabold et al. 2019).

### **3.4. Farmacocinética**

Os canabinoides são facilmente absorvidos devido às suas propriedades hidrofóbicas e lipossolúveis (Miranda-Cortés et al. 2023), tendo sido demonstrado uma absorção 4 vezes maior quando consumidos com comida, e uma concentração máxima 14 vezes superior. Comparativamente a um estudo realizado com administração de CBD em líquido, a

concentração máxima mostrou-se muito mais elevada quando o CBD foi administrado em cápsulas (Birnbaum et al. 2019). Um estudo administrou 5 mg/kg de CBD em 9 gatos, em jejum e alimentados, e concluiu que este deveria ser administrado pouco tempo após uma refeição (Jukier et al. 2023). Em contrapartida, a sua natureza lipofílica leva a uma maior acumulação a longo-prazo em tecidos e a sua toxicidade pode ser uma preocupação (Greb and Puschner 2018, De Briyne et al. 2021, Yu and Rupasinghe 2021). Um estudo observou uma grande variabilidade das propriedades farmacocinéticas entre indivíduos da mesma espécie, suspeitando-se que se devesse à diferença de condição corporal entre os mesmos. Servindo a gordura como um reservatório para a substância em estudo, a variabilidade na condição corporal levou à diferente acumulação de CBD no tecido (Rozenal et al. 2023).

Após a chegada dos canabinoides à corrente sanguínea, ligam-se a lipoproteínas, albumina e eritrócitos e, após se acoplar aos recetores CB1 e CB2, os seus efeitos podem ser observados de 0,5 a 2 horas após a administração. Estas substâncias podem acumular-se no tecido adiposo, no fígado, pulmões, baço, cérebro e músculos e continuar a sua libertação mesmo após a redução rápida dos seus níveis plasmáticos. Derivados naturais como o 19-THC são metabolizados por hidroxilação, descarboxilação e conjugação hepática por isoenzimas CYP2C do citocromo P450, e também por tecidos extra-hepáticos como o intestino e os pulmões. Sabe-se que o CBD e o THC interferem com a atividade de várias famílias enzimáticas do citocromo P450, podendo levar ao aumento dos níveis séricos de outros fármacos administrados em concomitância. A excreção destes compostos dá-se por eliminação fecal e biliar (Miranda-Cortés et al. 2023).

Comparando diferentes técnicas de administração, a administração oral de CBD permitiu atingir os maiores valores de concentração máxima sistémica (Yu and Rupasinghe 2021). No entanto, devido a um efeito de primeira passagem extenso no fígado, a sua biodisponibilidade é reduzida (Birnbaum et al. 2019, De Briyne et al. 2021, Yu and Rupasinghe 2021, Miranda-Cortés et al. 2023).

Alguns parâmetros farmacocinéticos mostraram diferenças significativas entre o cão e o gato (Yu and Rupasinghe 2021, Miranda-Cortés et al. 2023). No cão demora 1,4 horas a atingir concentração máxima e no gato 2 horas, e o gato apresenta concentrações séricas inferiores comparativamente ao cão (Deabold et al. 2019). Isto sugere a necessidade de recomendações de doses diferentes para ambas as espécies (Yu and Rupasinghe 2021).

Resultados farmacocinéticos geralmente indicam que o CBD é uma substância segura, no entanto, este poderá possuir efeitos imunossupressores que, embora terapêuticos para doenças autoimunes, poderá constituir um risco para animais imunocomprometidos (Yu and Rupasinghe 2021).

### **3.5. Ação Terapêutica**

A indústria do canabidiol tem vindo a aumentar exponencialmente, com detentores a recorrer cada vez mais a produtos que contêm canabinoides, procurando benefícios terapêuticos para os seus animais de companhia (Greb and Puschner 2018). O canabidiol é um composto natural seguro e bem tolerado (Mlost et al. 2020) que, em doses baixas, possui efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores que promovem a saúde (Iffland et al. 2017). O uso terapêutico do CBD tem várias áreas de interesse nomeadamente a dor, condições respiratórias e cardiovasculares, doenças imunomediadas, epilepsia e alergias inflamatórias (De Briyne et al. 2021).

#### **3.5.1. Analgésico**

Vários ensaios clínicos e estudos em diversos modelos animais demonstraram o efeito analgésico do CBD, podendo os seus efeitos variar consoante a sua dose e a sua via de administração (Mlost et al. 2020). Animais de companhia experienciam diversos tipos de dor: aguda, crónica, oncológica e neuropática (Yu and Rupasinghe 2021). Suspeita-se que as propriedades lipofílicas dos canabinoides permita-lhes atravessar a barreira hematoencefálica e, conseqüentemente, proporcionar analgesia (Miranda-Cortés et al. 2023). Os endocanabinoides endógenos AEA e 2-AG são um dos primeiros grupos a responder a uma lesão tecidual. AEA suprime a dor por vários mecanismos: ao ativar recetores CB1 para inibir a sinalização da dor na sinapse, ao ser transformada por COX-2 em prostamidas aliviantes da dor, e ao ativar outros recetores como o CB2 e conseqüentemente interferir com a inflamação. 2-AG está envolvida na modulação descendente da dor durante stress agudo (Yu and Rupasinghe 2021, Miranda-Cortés et al. 2023). No entanto, ainda surgem questões acerca do mecanismo de controlo da dor por canabinoides, uma vez que não há a certeza se os seus efeitos se devem aos efeitos agonistas nos recetores CB1 e CB2, se pela interação com moduladores e inibição de neurotransmissores e péptidos opioides endógenos envolvidos na modulação da dor em cães e gatos (Miranda-Cortés et al. 2023). Suspeita-se que os recetores VR1 e de glicina também possam contribuir para este efeito analgésico (Greb and Puschner 2018, Britch et al. 2020). Estudos direcionados para o controlo de dor crónica em animais de companhia são, maioritariamente, relacionados com osteoartrite, onde cães se mostraram mais confortáveis e ativos após administração de um extrato de cânhamo rico em CBD (Gamble et al. 2018).

#### **3.5.2. Anti-inflamatório**

Sob condições normais, inflamação é um mecanismo protetor crucial para o processo de cicatrização, no entanto, em condições patológicas, pode causar dor crônica através da ativação de neurónios sensoriais (Mlost et al. 2020).

O CBD atenua a inflamação ao suprimir citocinas e quimioquinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IFN- $\gamma$ , e IL-6 (Yu and Rupasinghe 2021), ao estimular a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Silver 2019, Verrico et al. 2020), ao limitar a infiltração de células imunitárias, ao induzir a apoptose de células T, ao inibir a proliferação de células T efetoras, e ao promover a proliferação de células T reguladoras (Rieder et al. 2010, Yu and Rupasinghe 2021). Contrariamente, Britch et al. (2020) mostrou que o CBD reduzia os níveis de IL-10 e aumentava os níveis de IL-6. Um grupo de investigadores mostrou ainda que o CBD, em concentrações ótimas, despoleta a apoptose de linfócitos T CD4+ e CD8+ de uma forma dependente da dose e do tempo, e que a apoptose de células imunitárias está relacionada com a ativação de recetores CB2. Desta forma, atingir estes recetores pode mostrar-se um novo método terapêutico de doenças inflamatórias e autoimunes (Rieder et al. 2010). Um estudo de Miragliotta et al. (2018) mostrou ainda a presença de recetores CB1 e CB2 em gatos com dermatite hipersensível e em gatos saudáveis, com uma sobreexpressão dos mesmos em gatos com dermatite, o que apoia a suspeita de que estes recetores estão envolvidos na atenuação da resposta cutânea alérgica.

Propriedades antimicrobianas também foram reportadas em fitocanabinoides, e demonstraram que o CBD é eficaz contra a placa bacteriana dentária em humanos. Desta forma, sugere-se a utilidade de fitocanabinoides na modulação da inflamação e da dor associada a GECF (Polidoro et al. 2021). Os efeitos anti-inflamatórios do CBD ainda são incertos (Mlost et al. 2020) devido ao seu mecanismo complexo e muito provavelmente multifatorial (Corsato et al. 2023) mas promissores, sendo necessários mais estudos para clarificar esse mecanismo (Mlost et al. 2020).

### **3.5.3. Outros**

O SEC tem um papel íntimo com a regulação da resposta ao stress, e estudos em murganhos evidenciaram efeitos ansiolíticos do CBD através da ativação dos recetores CB2 (Yu and Rupasinghe 2021), CB1, 5-HT1A (Yu and Rupasinghe 2021, Corsato et al. 2023) e TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*). Curiosamente, a ação ansiolítica do canabidiol apenas se observou com doses moderadas da substância, e não com níveis baixos ou demasiado elevados (Corsato et al. 2023).

Os pacientes oncológicos beneficiam da administração de THC e CBD uma vez que aumentam o apetite, reduzem a náusea e reduzem os vômitos associados a quimioterapia (Fraguas-Sánchez and Torres-Suárez 2018). O efeito do CBD atua através de vários

mecanismos, nomeadamente na inibição da proliferação e na indução da apoptose das linhas celulares tumorais (Machado et al. 2011), inibição da migração e invasão de células endoteliais e inibição da angiogénese (Ozarowski et al. 2021).

Por último, fortes evidências suportam o benefício do CBD como uma substância anticonvulsiva (Fraguas-Sánchez and Torres-Suárez 2018, Yu and Rupasinghe 2021), havendo resultados promissores em modelos animais acerca dos efeitos antiepiléticos e anticonvulsivos dos canabinoides (Ozarowski et al. 2021). Um estudo realizado maioritariamente em crianças com epilepsia grave e refratária aos tratamentos convencionais verificou uma redução em 45% na frequência de convulsões quando o CBD foi administrado concomitantemente com a medicação convencional (Iffland et al. 2017).

### **3.6. Efeitos adversos**

Em gatos, os estudos indicam que o CBD é uma substância tolerável e segura, apesar de se observarem sinais de aversão ao sabor ou ao cheiro como salivação e abanar a cabeça após a administração (Deabold et al. 2019, Kulpa et al. 2021, Coelho et al. 2023).

Os efeitos adversos da administração de canabidiol são ligeiros a moderados, sendo os mais comuns os gastrointestinais, a sonolência e as alterações de apetite (Fraguas-Sánchez and Torres-Suárez 2018, Souza et al. 2022, Corsato et al. 2023). Dois estudos analisaram a alteração de parâmetros bioquímicos após a administração de CBD em gatos saudáveis, onde observaram a diminuição de BUN (Deabold et al. 2019, Rozental et al. 2023) e de creatinina (Rozental et al. 2023). Num estudo de Ewing et al. (2019), CBD administrado oralmente em doses de 615 mg/kg mostrou sinais de hepatotoxicidade, com aumento dos níveis de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e bilirrubina total sérica. Em cães tratados com CBD, observou-se o aumento da fosfatase alcalina, o que pode ser justificado pela indução da metabolização oxidativa mediada pelo citocromo P450, no fígado (Gamble et al. 2018, Deabold et al. 2019, Miranda-Cortés et al. 2023), especificamente pelo citocromo P450 2C19 (Greb and Puschner 2018). Assim, o uso concomitante de outros fármacos metabolizados por este mecanismo poderão alterar a farmacocinética do CBD (Silver 2019).

# **PARTE III – ENSAIO CLÍNICO SOBRE A AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO CANABIDIOL EM GATOS COM GENGIVOESTOMATITE CRÓNICA**

## **1. Introdução**

A GECF é uma doença inflamatória imunomediada grave da mucosa oral dos gatos, com apresentação ulcerativa e/ou proliferativa. Trata-se de uma doença bastante complexa devido à sua etiopatogenia multifatorial (agentes infecciosos, fatores ambientais e outras doenças orais), cujo principal tratamento envolve extrações dentárias. No entanto, para além do manejo cirúrgico, a maioria dos casos beneficia de tratamento médico a longo prazo para controlar a inflamação (Lee et al. 2020).

Em resposta a uma reação inflamatória aguda, os mediadores inflamatórios produzem PFA, que podem aumentar a sua concentração sérica – PFA positivas como AGP e SAA, ou diminuir a sua concentração sérica – PFA negativas, como a albumina. Desta forma, a avaliação destas proteínas poderá ser útil na monitorização de tratamentos com efeito benéfico na inflamação (Céron et al. 2005).

Em medicina veterinária, particularmente em animais de companhia, o uso de CBD, um fitocanabinoide presente na planta canábica sem ação psicotrópica, tem vindo a aumentar devido às suas variadas propriedades, nomeadamente analgésicas, anti-inflamatórias, anticonvulsivas e ansiolíticas (Deabold et al. 2019). Coloca-se então a hipótese de que o CBD poderá contribuir de forma benéfica no controlo da inflamação oral em gatos com GECF considerados refratários a outros tratamentos médicos.

## **2. Objetivos**

O presente estudo teve como objetivo avaliar a evolução de três proteínas de fase aguda (AGP, SAA e albumina) em gatos diagnosticados com GECF, ao longo de um tratamento de 30 dias com uma formulação em óleo que contém CBD.

Os objetivos específicos incluíram:

- a determinação das concentrações séricas de AGP, SAA e albumina no início e no final do tratamento;
- a comparação das concentrações séricas destas PFA entre dois grupos: um grupo de casos (medicado com CBD) e um grupo controlo (medicado com placebo).

## **3. Materiais e Métodos**

### **3.1. Desenho de estudo**

Estudo randomizado duplamente cego, controlado por placebo.

### **3.2. Amostra**

O estudo decorreu entre o dia 23 de novembro de 2022 e 1 de outubro de 2023. Todos os animais foram atendidos pelos serviços de estomatologia e cirurgia oral do HEV-FMV da Universidade de Lisboa.

#### **3.2.1. Critérios de inclusão**

Foram incluídos todos os gatos com diagnóstico de GECF tratados com extrações dentárias há mais de 3 meses e com necessidade de tratamento adjuvante para além deste período.

#### **3.2.2. Critérios de exclusão**

Foram excluídos todos os animais diagnosticados com outras comorbilidades ou que desenvolveram alterações sistémicas ao longo do estudo, animais positivos a FeLV, e animais com temperamento agressivo que impossibilitasse a sua manipulação para a avaliação clínica e para a administração diária do óleo. Uma vez que se trata de animais com doença moderada a grave, e o estudo implica a administração exclusiva do óleo, foram também excluídos os animais que não conseguiram terminar o desmame da medicação para iniciar o estudo, por regressão acentuada dos sinais clínicos.

#### **3.2.3. Grupos e protocolo**

Foram definidos 2 grupos de acordo com o tratamento realizado. O grupo CBD correspondeu aos animais medicados com a formulação contendo a substância ativa. O grupo PLAC correspondeu aos animais medicados com a formulação placebo. A formulação foi idêntica em constituição e aspeto, diferindo apenas na inclusão da substância ativa (o CBD) na concentração de 30 mg/ml.

O grupo CBD foi medicado com uma formulação em óleo de CBD na posologia de 2 mg/kg duas vezes por dia durante 30 dias, enquanto o grupo PLAC foi medicado com a formulação sem a substância ativa, durante o mesmo período de tempo.

#### **3.2.4. Atribuição dos casos recrutados pelos grupos**

A atribuição do óleo com ou sem CBD foi definida por um método de randomização simples, através de um site denominado random.org. Desta forma, cada animal teve 50% de probabilidade de receber o tratamento.

### 3.2.5. Considerações éticas

O protocolo para a realização deste projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para a Investigação e Ensino (CEIE) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (Anexo 2). Todos os detentores assinaram um termo de consentimento informado a autorizar a inclusão do animal no estudo (Anexo 3).

### 3.3. Procedimentos

#### 3.3.1. Consultas

Para a admissão dos animais no projeto, foi recolhida a anamnese para conhecer o estado anímico, o estatuto FIV e FeLV e o estilo de vida do paciente, e procedeu-se ao seu exame físico e estomatológico, com registos fotográficos da cavidade oral. Foi realizado um inquérito sobre o seu apetite e tipo de alimentação, nível de atividade, hábitos de limpeza e higiene, e o parecer do detentor quanto ao conforto do animal (Anexo 4). A doença foi estadeada com base na classificação SDAI (Anexo 5), e o peso e número de resgates analgésicos registados. Estes procedimentos foram realizados ao dia 0, 7, 15, 21 e 30 após inclusão no estudo. Aos dias 0 e 30 procedeu-se à recolha sanguínea para o doseamento das proteínas em estudo (Tabela 1).

Tabela 1 - Procedimentos realizados semanalmente durante os 30 dias do estudo.

	Inquérito detentor + SDAI	Peso	Registo fotográfico	Recolha sanguínea
Dia 0	✓	✓	✓	✓
Dia 7	✓	✓	✓	X
Dia 15	✓	✓	✓	X
Dia 21	✓	✓	✓	X
Dia 30	✓	✓	✓	✓

#### 3.3.2. Recolha de amostras sanguíneas

A recolha de amostras sanguíneas ocorreu no primeiro e último dia do estudo, durante a consulta de reavaliação, de forma asséptica, e consistiu na recolha de 2ml de sangue periférico. Num tubo de heparina, foram colocados 0,5ml para o doseamento imediato da albumina, e 1,5ml foram deixados a repousar durante 30 minutos, posteriormente centrifugados a 7000 rotações por minuto durante 5 minutos, e o soro recolhido e armazenado a -20°C para posterior doseamento.



### **3.3.3. Doseamento da AGP**

O doseamento da AGP realizou-se através de um kit comercial de ELISA, Cat alpha-1 acid glycoprotein (AGP) ELISA Life Diagnostics, Inc. Este consiste numa fase sólida com anticorpos felinos purificados de AGP para a imobilização, e anticorpos de AGP felinos conjugados com peroxidase de rábano para deteção. Após a diluição de  $3,2 \times 10^4$  vezes, e incubação das amostras, as moléculas de AGP ficam presas entre os anticorpos de imobilização e deteção. Posteriormente, é adicionado um corante TMB que lhes atribui a cor azul na presença da AGP. É adicionada uma solução de paragem que altera a cor para amarelo, e medida a absorvância, no espectrofotómetro, a 450nm.

A concentração da AGP é proporcional à absorvância e calculada a partir de uma curva de calibração previamente elaborada. De forma a obter a concentração em  $\mu\text{g/ml}$ , é multiplicada a concentração obtida pelo seu fator de diluição.

### **3.3.4. Diluições seriadas da SAA**

Pressupôs-se que a amostra com a maior concentração de AGP apresentaria o maior estado inflamatório e, conseqüentemente, a maior concentração de SAA; e que a amostra com menor concentração de AGP apresentaria o menor estado inflamatório e, conseqüentemente, a menor concentração de SAA.

Desta forma, para definir o melhor fator de diluição para o doseamento da SAA, ou seja, o fator de diluição que abrangeria todos os valores de inflamação da totalidade da amostra, foram selecionadas duas amostras com valores extremos de AGP (a que possuía maior concentração de AGP – Gato 1, e a que possuía menor concentração de AGP – Gato 2). Realizaram-se diluições seriadas para ambas as amostras, num fator de 250, 500, 1000, 2000, 4000 e 8000 vezes, e procedeu-se ao doseamento da SAA das duas amostras através do kit comercial de ELISA Cat serum amyloid A (SAA) ELISA Life Diagnostics, Inc.

### **3.3.5. Doseamento da SAA**

O doseamento da SAA realizou-se através do kit comercial de ELISA utilizado para as diluições seriadas, Cat serum amyloid A (SAA) ELISA Life Diagnostics, Inc. Este consiste, à semelhança do kit de AGP, numa fase sólida com anticorpos felinos purificados SAA para a imobilização, e anticorpos de SAA felinos conjugados com peroxidase de rábano para deteção. Para a preparação das amostras, foram recolhidos 20 $\mu\text{l}$  de cada amostra para serem desnaturados em banho-maria a 60°C durante uma hora. Posteriormente, foram diluídos num fator de 250 vezes e prosseguiu-se com a sua incubação, que leva as moléculas SAA a ficarem presas entre os anticorpos de imobilização e deteção. Posteriormente, é adicionado

um corante TMB que lhes atribui a cor azul na presença da SAA. É adicionada uma solução de paragem que altera a cor para amarelo, e medida a absorvância, no espectrofotómetro, a 450nm.

É elaborada uma curva de calibração, e usada para calcular a concentração de SAA proporcional à absorvância. Posteriormente, para obter a concentração em  $\mu\text{g/ml}$ , é multiplicada a concentração de SAA pelo seu fator de diluição.

### **3.3.6. Doseamento da albumina**

O doseamento da albumina foi realizado no laboratório de Análises Clínicas Pf. Dr. Braço Forte da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, e o método de doseamento consiste num teste fotométrico com Verde de Bromocresol. O procedimento envolve um reagente, o Verde de Bromocresol, que forma um complexo colorimétrico com a albumina na presença de pH ligeiramente ácido, alterando a sua coloração de amarelo-verde para verde-azul.

### **3.3.7. Rácio AGP/Alb**

O rácio entre a concentração de AGP e a concentração de albumina foi calculado após a obtenção dos seus valores em  $\mu\text{g/ml}$  e  $\text{g/dl}$ , respetivamente. O seu valor é o resultado da divisão da concentração de AGP pela concentração de albumina, e foi calculado para cada animal no tempo 0 e 30. Este rácio foi adaptado de Gruys et al (2006).

### **3.3.8. Análise estatística**

Os dados dos casos foram organizados numa folha de cálculo de Microsoft Excel 2016. Este programa foi também usado para a elaboração da curva de calibração das proteínas em análise e cálculo das concentrações das mesmas.

Para a estatística inferencial foi utilizado o R 4.3.1 (*R Core Team, 2023*). Neste programa recorreu-se aos modelos lineares generalizados mistos (GLMM) para analisar as medições das proteínas AGP, SAA e albumina, do rácio AGP/Alb, da classificação SDAI e do peso. Foi analisado o efeito do grupo, o efeito do tempo, e a interação entre o grupo e o tempo, tendo-se usado como fator aleatório o animal e como variáveis fixas o grupo medicado com placebo e o tempo ao dia 0. Utilizou-se também o coeficiente de correlação de Spearman para avaliar a relação entre a concentração das proteínas e a classificação SDAI, e entre a proteína SAA e o rácio AGP/Alb. Todos os gráficos foram elaborados neste programa.

Para toda a análise estatística foi considerando um intervalo de confiança de 95%, sendo apenas os valores de  $p$  (nível de significância) inferiores a 0,05 considerados estatisticamente significativos.

## 4. Resultados

### 4.1. Caracterização da amostra

Foram incluídos 12 animais no estudo. Destes 12, 4 desistiram antes do término do mesmo. Assim, 8 animais constituíram a amostra analisada, 4 alocados ao grupo CBD e os outros 4 ao grupo PLAC. No total, 25% dos gatos eram fêmeas (2/8) e 75% eram machos (6/8), a sua idade média foi de 8,8 anos (média de 7 anos no grupo CBD e 10,5 anos no grupo PLAC) e o seu peso vivo médio no momento de inclusão no estudo de 4,6 kg (média de 5,07 kg no grupo CBD e 4,14 kg no grupo PLAC). A cada grupo pertencia 1 gato FIV positivo (1/4, 25%) e todos eram FeLV negativos (Tabela 2). Todos os gatos realizaram extrações dentárias totais (7/8, 88%) ou parciais (1/8, 12%) há mais de três meses.

**Tabela 2 - Caracterização da amostra.**

Animal	Raça	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Estatuto FIV
1CBD	SRD	F	8	4,45	Negativo
2CBD	SRD	M	8	6,83	Negativo
3CBD	SRD	M	8	4,87	Positivo
4CBD	SRD	F	4	4,12	Negativo
1PLAC	SRD	M	9	4,10	Positivo
2PLAC	SRD	M	17	4,80	Negativo
3PLAC	SRD	M	9	4,04	Negativo
4PLAC	SRD	M	8	3,62	Negativo

SDR – sem raça definida; F – feminino; M – masculino; FIV – vírus da imunodeficiência felino.

### 4.2. Comparação entre grupos

#### 4.2.1. Peso

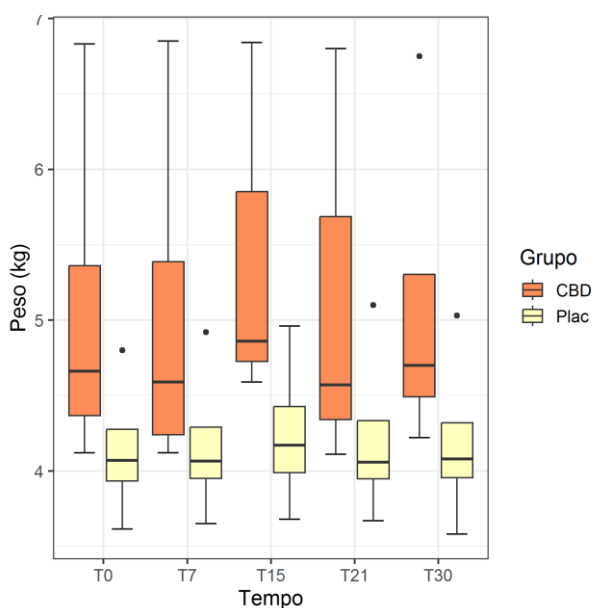
A média de peso dos animais nos diferentes momentos, assim como a sua evolução e comparação encontra-se ilustrada na Tabela 3 e no Gráfico 3. Não se verificaram alterações estatisticamente significativas na interação do grupo com o tempo em nenhum dos momentos, no entanto, observou-se um efeito do tempo significativo, ao dia 15, com um valor de  $p=0,012$ , representado na Tabela 5.

**Tabela 3 - Valores do Peso nos gatos medicados com CBD e com Placebo, semanalmente, durante o tratamento.**

Animal	Peso (kg) T0	Peso (kg) T7	Peso (kg) T15	Peso (kg) T21	Peso (kg) T30	Média (kg) T0	Média (kg) T30
1CBD	4,45	4,28	4,59	4,57	4,58	5,07 (Dp 1,21)	5,09 (Dp 1,13)
2CBD	6,83	6,85	6,84	6,80	6,75		
3CBD	4,87	4,90	4,86	NA	4,82		
4CBD	4,12	4,12	NA	4,11	4,22		
1PLAC	4,10	4,08	4,25	4,10	4,08	4,14 (Dp 0,49)	4,19 (Dp 0,61)
2PLAC	4,80	4,92	4,96	5,10	5,03		
3PLAC	4,04	4,05	4,09	4,04	4,08		
4PLAC	3,62	3,65	3,68	3,67	3,58		

Valor médio do peso apresentado por média (desvio-padrão); T0, T7, T15, T21 e T30 – dia 0, dia 7, dia 15, dia 21 e dia 30, respetivamente; kg – unidade de quilograma; Dp - desvio-padrão; NA – dia em que não foi executada a avaliação do animal.

**Gráfico 3 - Representação gráfica do peso dos animais, no grupo PLAC e no grupo CBD, ao dia 0, 7, 15, 21 e 30.**



#### 4.2.2. Classificação SDAI

A Tabela 4 e o Gráfico 4 representam a classificação SDAI obtida em todos os tempos, observando-se uma diminuição dos seus valores tanto no grupo CBD como no grupo PLAC.

Observaram-se diferenças estatisticamente significativas na interação entre o grupo e o tempo ao dia 7 e dia 15,  $p=0,048$  e  $p=0,002$ , respetivamente (Tabela 5).

**Tabela 4 - Valores da classificação SDAI nos gatos medicados com CBD e com Placebo, semanalmente, durante o tratamento.**

Animal	SDAI T0	SDAI T7	SDAI T15	SDAI T21	SDAI T30	Média T0	Média T30
1CBD	11,50	13,12	14,25	11,12	11	11,80 (Dp 1,34)	11,30 (Dp 1,30)
2CBD	12	13,75	15,25	14,25	13,25		
3CBD	10,25	10,25	9,25	NA	10,25		
4CBD	13,50	13,75	NA	12	11		
1PLAC	20,25	20,25	18,50	21,25	20,50	16,20 (Dp 6,10)	15,90 (Dp 6,40)
2PLAC	7,50	7	7	7	7		
3PLAC	16,50	15,50	15,50	15,50	15,50		
4PLAC	20,75	20,75	20,75	20,75	20,75		

Valor médio do SDAI apresentado por média (desvio-padrão); T0, T7, T15, T21 e T30 – dia 0, dia 7, dia 15, dia 21 e dia 30, respetivamente; Dp – desvio-padrão; NA – dia em que não foi executada a avaliação do animal.

**Gráfico 4 - Representação gráfica da classificação SDAI, no grupo PLAC e no grupo CBD, ao dia 0, 7, 15, 21 e 30.**

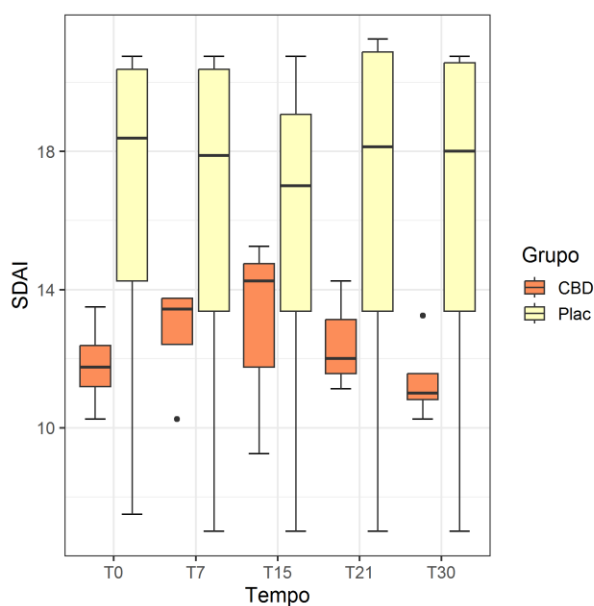


Tabela 5 - Avaliação estatística por GLMM do SDAI e do Peso, entre o grupo CBD e o grupo PLAC, ao dia 0, 7, 15, 21 e 30.

GLMM				
	Coeficiente	Erro Padrão	Valor t	Valor p
<b>Peso</b>				
Interceção	4,139	0,559	7,408	
Grupo (CBD)	0,877	0,772	1,136	0,256
Tempo (T7)	0,036	0,044	0,831	0,406
Tempo (T15)	0,106	0,044	2,435	<b>0,012</b>
Tempo (T21)	0,083	0,044	1,902	0,057
Tempo (T30)	0,054	0,044	1,232	0,218
CBD:T7	-0,066	0,062	-1,074	0,283
CBD:T15	-0,053	0,065	-0,819	0,413
CBD:T21	-0,063	0,065	-0,969	0,333
CBD:T30	-0,029	0,062	-0,467	0,641
<b>SDAI</b>				
Interceção	16,250	2,030	8,040	
Grupo (CBD)	-4,438	2,870	-1,546	0,122
Tempo (T7)	-0,375	0,459	-0,817	0,414
Tempo (T15)	-0,812	0,459	-1,771	0,076
Tempo (T21)	-0,125	0,459	-0,272	0,785
Tempo (T30)	-0,312	0,459	-0,681	0,496
CBD:T7	1,281	0,649	1,975	<b>0,048</b>
CBD:T15	2,135	0,682	3,131	<b>0,002</b>
CBD:T21	0,022	0,682	0,033	0,974
CBD:T30	-0,125	0,649	-0,193	0,847

Grupo PLAC e T0 utilizados como fatores fixos de referência; a negrito os valores de  $p < 0,05$  (resultado estatisticamente significativo); Interceção – fator aleatório do animal; T7, T15, T21 e T30 – dia 7, dia 15, dia 21 e dia 30, respetivamente; : - interação.

#### 4.2.3. Concentração de AGP

As concentrações de AGP obtidas encontram-se sumarizadas na Tabela 6 e representadas no Gráfico 5. A média de todos os animais ao dia 0 foi de 477,1  $\mu\text{g/ml}$  e no dia 30 de 545,8  $\mu\text{g/ml}$ . No grupo CBD diminuiu de 391,7  $\mu\text{g/ml}$  para 370,6  $\mu\text{g/ml}$  e, no grupo PLAC, aumentou de 562,5  $\mu\text{g/ml}$  para 720,9  $\mu\text{g/ml}$ . Através da análise estatística por GLMM,

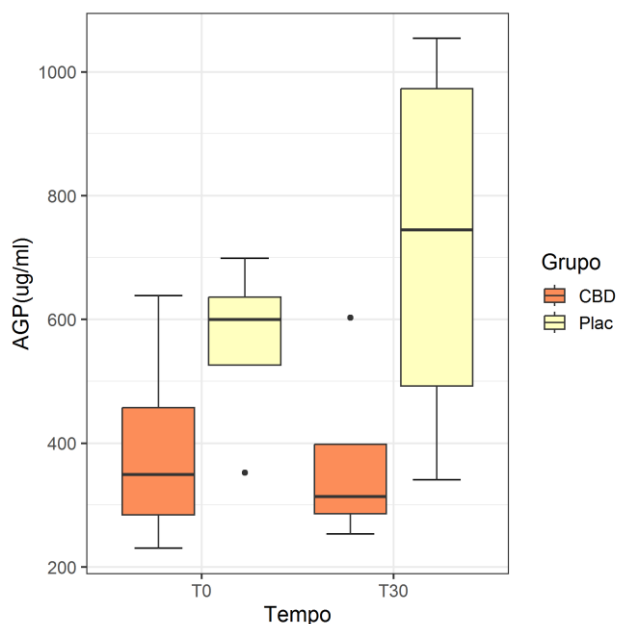
observou-se um efeito significativo do tempo ( $p < 0,001$ ) e da interação do grupo CBD com o tempo ( $p = 0,006$ ), na concentração da AGP (Tabela 11).

**Tabela 6 - Concentração de AGP nos gatos medicados com CBD e com Placebo, antes e depois do tratamento.**

Animal	AGP ( $\mu\text{g/ml}$ ) T0	AGP ( $\mu\text{g/ml}$ ) T30	Média ( $\mu\text{g/ml}$ ) T0	Média ( $\mu\text{g/ml}$ ) T30
1CBD	302	296,3	391,7 (Dp 178,1)	370,6 (Dp 157,9)
2CBD	396,6	330,2		
3CBD	638,4	602,8		
4CBD	229,9	253,2		
1PLAC	614,8	945,6	562,5 (Dp 148,2)	720,9 (Dp 335,5)
2PLAC	352,4	340,8		
3PLAC	584	543,1		
4PLAC	698,8	1054,3		

Valor médio da AGP apresentado por média (desvio-padrão); AGP – alfa-1 glicoproteína ácida; T0 e T30 – dia 0 e dia 30, respectivamente;  $\mu\text{g/ml}$  – unidade de micrograma por mililitro; Dp - desvio-padrão.

**Gráfico 5 - Representação gráfica da concentração da AGP, no grupo PLAC e no grupo CBD, ao dia 0 e 30.**



#### 4.2.4. Concentração de SAA

##### 4.2.4.1. Diluição da amostra para execução do Kit ELISA

Foram realizadas diluições seriadas com um fator de 250, 500, 1000, 2000, 4000 e 8000 vezes no Gato 1 (amostra com maior concentração de AGP) e no Gato 2 (amostra com menor concentração de AGP). A diluição que melhor abrangeu os valores de absorvância para a medição de ambos os casos em simultâneo foi a de 250 vezes (Tabela 7), sendo o fator de diluição usado para a medição de SAA em todas as amostras do presente ensaio.

**Tabela 7 - Valores de absorvância consoante as diferentes diluições das duas amostras de soro com níveis extremos de inflamação sistémica.**

Amostra	Diluição	A450nm
<b>GATO 1</b>	250	3,438
	500	3,284
	1000	3,084
	2000	2,318
	4000	1,341
	8000	0,554
<b>GATO 2</b>	250	0,166
	500	0,136
	1000	0,157
	2000	0,092
	4000*	0,120
	8000*	0,180

A450nm – absorvância a 450 nanómetros; \*Fator de diluição demasiado elevado, logo, não se consideraram as absorvâncias correspondentes valores coerentes.

##### 4.2.4.2. Resultados de SAA

A média de SAA na totalidade da amostra foi de 1,88 µg/ml no dia 0 e 1,66 µg/ml no dia 30. Verificou-se uma diminuição da concentração média de SAA de 0,96 µg/ml para 0,48 µg/ml no grupo CBD, e o seu aumento de 2,79 µg/ml para 2,84 µg/ml no grupo PLAC (Tabela 8 e Gráfico 6). A análise estatística por GLMM apresentou um efeito estatisticamente significativo da interação do grupo CBD com o tempo, com um valor de  $p=0,026$ , na concentração da SAA (Tabela 11).

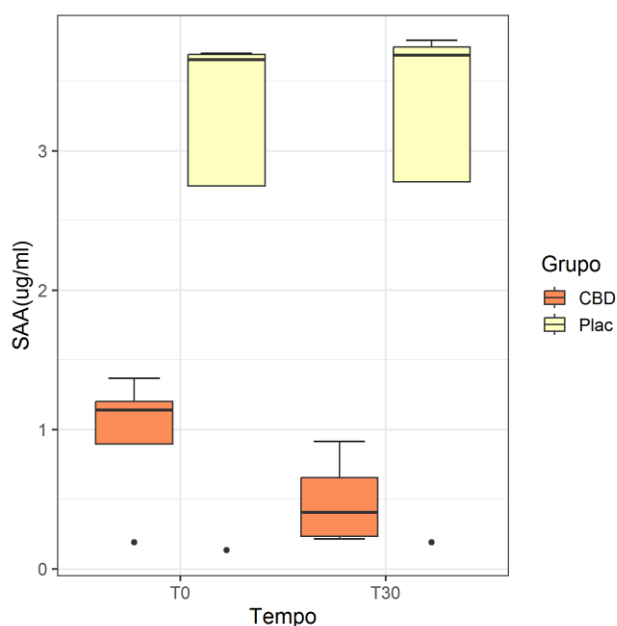


**Tabela 8 - Concentração de SAA nos gatos medicados com CBD e com Placebo, antes e depois do tratamento.**

Animal	SAA (µg/ml) T0	SAA (µg/ml) T30	Média (µg/ml) T0	Média (µg/ml) T30
1CBD	1,15	0,91	0,96 (Dp 0,52)	0,48 (Dp 0,33)
2CBD	1,13	0,21		
3CBD	1,37	0,24		
4CBD	0,19	0,57		
1PLAC	3,70	3,64	2,79 (Dp 1,78)	2,84 (Dp 1,77)
2PLAC	0,13	0,19		
3PLAC	3,69	3,73		
4PLAC	3,62	3,79		

Valor médio da SAA apresentado por média (desvio-padrão); SAA – proteína sérica amilóide A; T0 e T30 – dia 0 e dia 30, respectivamente; µg/ml – unidade de micrograma por mililitro; Dp - desvio-padrão.

**Gráfico 6 - Representação gráfica da concentração da SAA, no grupo PLAC e no grupo CBD, ao dia 0 e 30.**



#### 4.2.5. Concentração de albumina

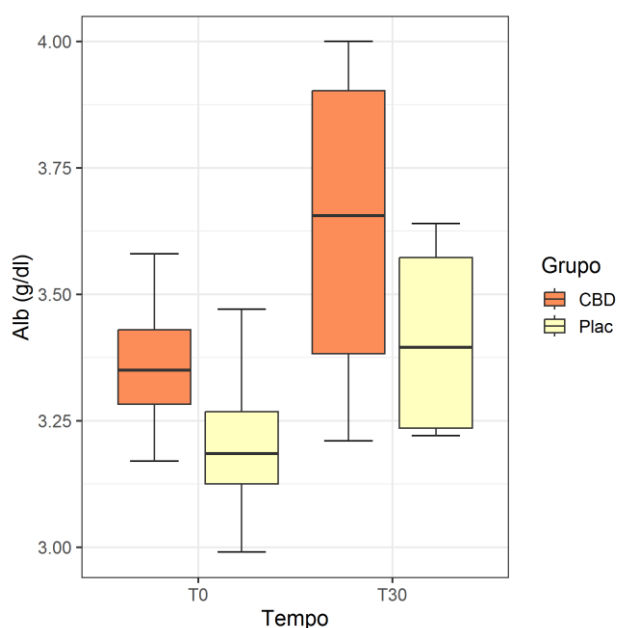
Como representado na Tabela 9 e Gráfico 7, verificou-se um aumento da média da concentração de albumina tanto no grupo CBD como no grupo PLAC, no entanto, não se observaram resultados significativos em nenhum dos fatores analisados (Tabela 11).

**Tabela 9 - Concentração de Albumina nos gatos medicados com CBD e com Placebo, antes e depois do tratamento.**

Animal	Alb (g/dl) T0	Alb (g/dl) T30	Média (g/dl) T0	Média (g/dl) T30
1CBD	3,32	3,21	3,36 (Dp 0,17)	3,63 (Dp 0,37)
2CBD	3,58	4		
3CBD	3,38	3,44		
4CBD	3,17	3,87		
1PLAC	2,99	3,64	3,21 (Dp 0,20)	3,41 (Dp 0,21)
2PLAC	3,47	3,24		
3PLAC	3,17	3,22		
4PLAC	3,20	3,55		

Valor médio da Alb apresentado por média (desvio-padrão); Alb – albumina; T0 e T30 – dia 0 e dia 30, respetivamente; g/dl – unidade de grama por decilitro; Dp - desvio-padrão.

**Gráfico 7 - Representação gráfica da concentração da Alb, no grupo PLAC e no grupo CBD, ao dia 0 e 30.**



#### 4.2.6. Rácio AGP/Alb

Calculou-se o rácio entre a concentração da AGP e a concentração de albumina, cujos valores estão representados na Tabela 10. No grupo CBD, a média reduziu de 115,8 para 103,9 e, no grupo PLAC, aumentou de 177,4 para 207,6 (Gráfico 8). Observou-se um efeito

significativo do fator tempo ( $p=0,002$ ) e da interação do grupo CBD com o tempo ( $p=0,002$ ), no valor do rácio (Tabela 11).

**Tabela 10 - Valores do Rácio AGP/Alb nos gatos medicados com CBD e com Placebo, antes e depois do tratamento.**

Animal	AGP/Alb T0	AGP/Alb T30	Média T0	Média T30
1CBD	90,9	92,3	115,8 (Dp 51,2)	103,9 (Dp 48,8)
2CBD	110,8	82,5		
3CBD	188,9	175,2		
4CBD	72,5	65,4		
1PLAC	205,6	259,8	177,4 (Dp 52,5)	207,6 (Dp 87)
2PLAC	101,6	105,2		
3PLAC	184,2	168,6		
4PLAC	218,4	297		

Valor médio do rácio AGP/Alb apresentado por média (desvio-padrão); Rácio AGP/Alb – rácio entre alfa-1 glicoproteína ácida e a albumina; T0 e T30 – dia 0 e dia 30, respetivamente; Dp - desvio-padrão.

**Gráfico 8 - Representação gráfica do valor do Rácio AGP/Alb, no grupo PLAC e no grupo CBD, ao dia 0 e 30.**

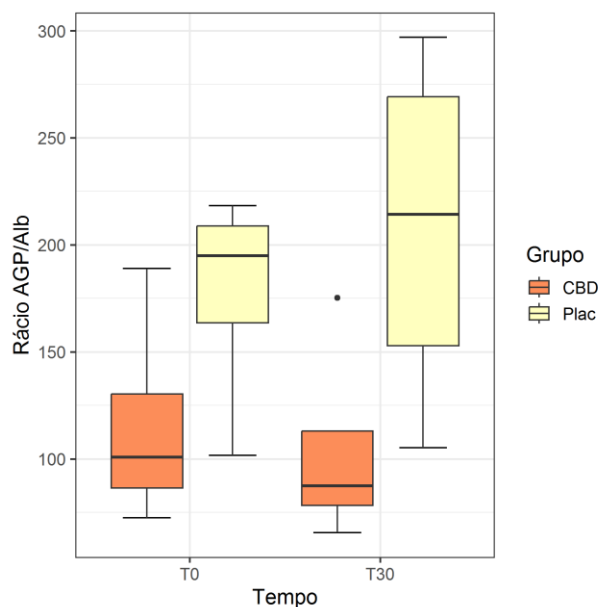


Tabela 11 - Avaliação estatística por GLMM da AGP, SAA, Albumina e Rácio AGP/Alb, entre o grupo CBD e o grupo PLAC, ao dia 0 e 30 após tratamento.

GLMM				
	Coeficiente	Erro Padrão	Valor t	Valor p
<b>AGP</b>				
Interceção	562,500	85,540	6,576	
Grupo (CBD)	-170,790	119,970	-1,424	0,154
Tempo (T30)	158,430	46,260	3,425	<b>&lt;0,001</b>
CBD:T30	-179,530	65,230	-2,752	<b>0,006</b>
<b>SAA</b>				
Interceção	2,785	0,702	3,967	
Grupo (CBD)	-1,828	0,993	-1,841	0,066
Tempo (T30)	0,054	0,168	0,319	0,750
CBD:T30	-0,528	0,237	-2,225	<b>0,026</b>
<b>Albumina</b>				
Interceção	3,208	0,120	26,633	
Grupo (CBD)	0,155	0,170	0,910	0,363
Tempo (T30)	0,205	0,132	1,559	0,119
CBD:T30	0,062	0,186	0,336	0,737
<b>Rácio AGP/Alb</b>				
Interceção	177,444	26,374	6,728	
Grupo (CBD)	-61,661	37,297	-1,653	0,098
Tempo (T30)	30,204	9,838	3,070	<b>0,002</b>
CBD:T30	-42,111	13,911	-3,027	<b>0,002</b>

Grupo PLAC e T0 utilizados como fatores fixos de referência; a negrito os valores de  $p < 0,05$  (resultado estatisticamente significativo); Interceção - fator aleatório do animal; T0 e T30 - dia 0 e dia 30, respetivamente; : - interação; AGP – alfa-1 glicoproteína ácida; SAA – proteína sérica amilóide A; Alb – albumina; Rácio AGP/Alb – rácio entre a alfa-1 glicoproteína ácida e a albumina.

### 4.3. Efeitos adversos

Todos os efeitos adversos foram registados semanalmente. O efeito sonolência foi relatado por 2 detentores, num gato do grupo CBD e num gato do grupo PLAC (Tabela 12). Fezes moles apenas se observaram num gato do grupo CBD. Da totalidade da amostra, 75% dos casos (6/8) não relataram efeitos adversos.

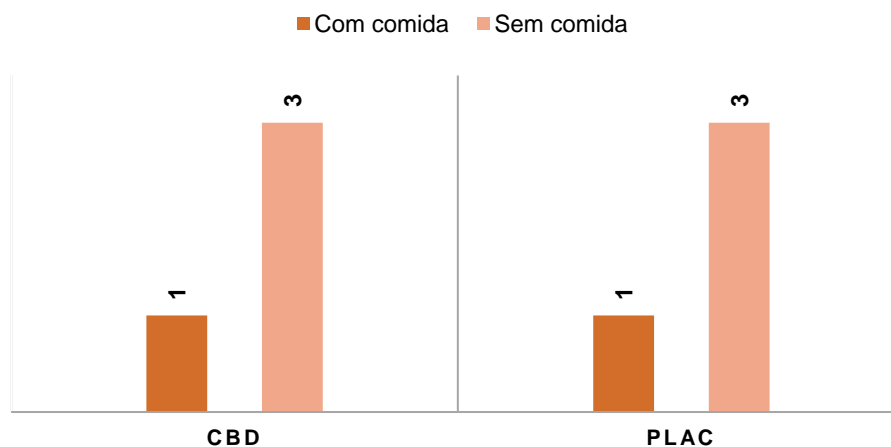
**Tabela 12 - Número de casos que apresentaram efeitos adversos, no grupo CBD e no grupo PLAC.**

<b>Animal</b>	<b>Sonolência</b>	<b>Fezes moles</b>
1CBD	Não	Não
2CBD	Não	Não
3CBD	Sim	Sim
4CBD	Não	Não
1PLAC	Não	Não
2PLAC	Não	Não
3PLAC	Sim	Não
4PLAC	Não	Não

#### 4.4. Palatabilidade

Foi recomendada a administração do tratamento, preferencialmente, em conjunto com alimento. Dos 8 animais em estudo, apenas 1 no grupo CBD e 1 no grupo PLAC ingeriram o óleo na comida, enquanto os restantes 6 necessitaram de administração direta oral, uma vez que rejeitavam a comida quando misturada com a formulação (Gráfico 9).

**Gráfico 9 - Representação gráfica do número de animais que ingeriu o óleo com e sem comida.**



#### 4.5. Desistências

Dos 4 animais que foram excluídos durante o estudo, 1 alocado no grupo PLAC desistiu por regressão dos sinais clínicos, 1 no grupo CBD foi retirado por comportamento agressivo à manipulação, e os restantes 2, do grupo CBD, não ingeriam o alimento com o CBD e não permitiam a administração oral forçada duas vezes ao dia (Tabela 13).

**Tabela 13 - Casos que desistiram, no grupo CBD e no grupo PLAC.**

	CBD	PLAC	Total
Regressão de sinais clínicos	0	1	1 (25%)
Agressividade	1	0	1 (25%)
Escape à administração	2	0	2 (50%)
<b>Total</b>	<b>3 (75%)</b>	<b>1 (25%)</b>	<b>4 (100%)</b>

#### 4.6. Resgates analgésicos

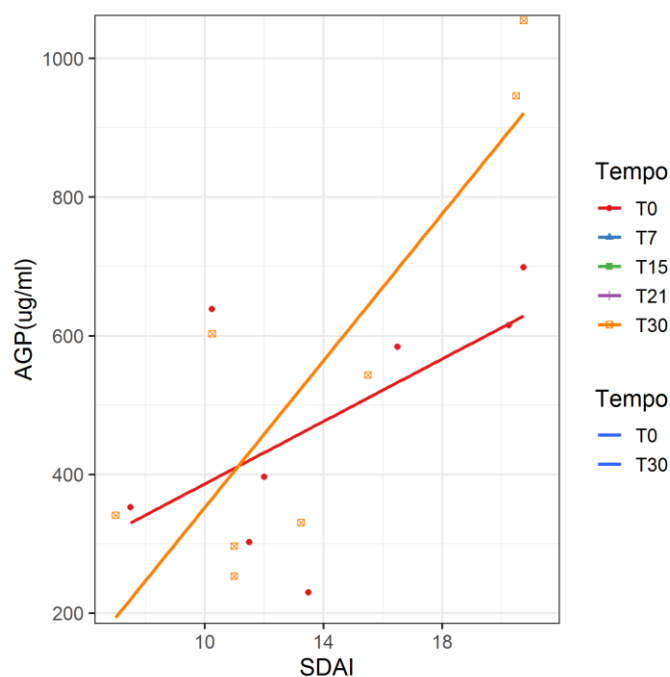
Em toda a amostra, apenas 1 dos animais no grupo PLAC (12%, 1/8) necessitou de resgate analgésico com buprenorfina, e nenhum dos gatos no grupo CBD recorreu a esse resgate.

#### 4.7. Correlação entre PFA e a classificação SDAI

##### 4.7.1. AGP-SDAI

Através da análise estatística com o coeficiente de correlação de Spearman, observou-se uma correlação positiva moderada entre as concentrações de AGP e as classificações SDAI, com resultado estatisticamente significativo ( $p=0,04$ ) (Gráfico 10 e Tabela 14).

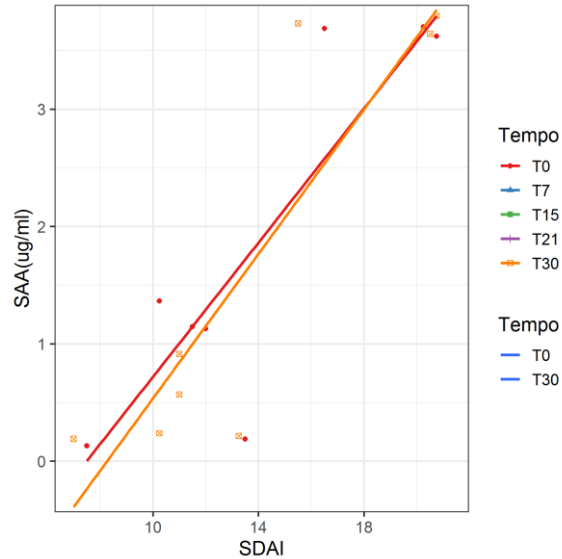
**Gráfico 10 - Representação gráfica da correlação entre a concentração de AGP e a classificação SDAI.**



##### 4.7.2. SAA-SDAI

Quanto à SAA, o Gráfico 11 demonstra uma correlação positiva forte entre esta proteína e a classificação SDAI, estatisticamente significativa ( $p=0,002$ ) (Tabela 14).

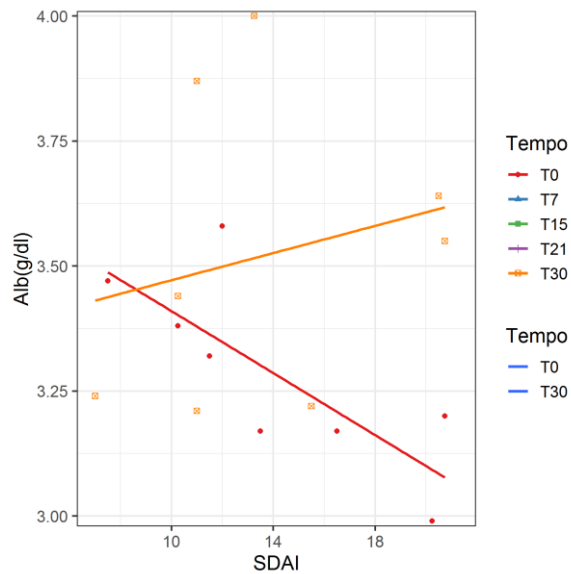
**Gráfico 11 - Representação gráfica da correlação entre a concentração de SAA e a classificação SDAI.**



#### 4.7.3. Albumina- SDAI

Entre a albumina e o SDAI, o teste de Spearman mostrou uma correlação negativa fraca, no entanto, sem significado estatístico (Gráfico 12 e Tabela 14).

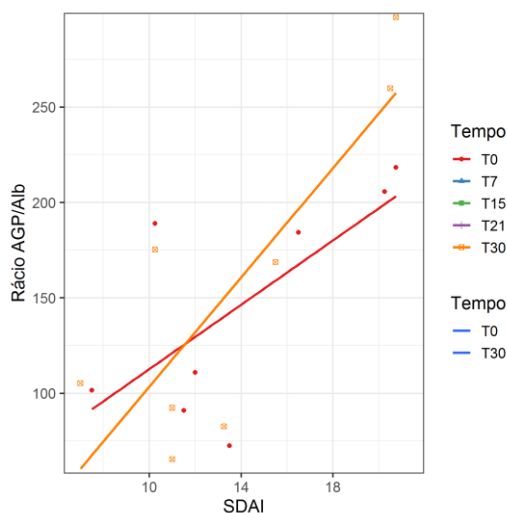
**Gráfico 12 - Representação gráfica da correlação entre a concentração de Albumina e a classificação SDAI.**



#### 4.7.4. Rácio AGP/Alb-SDAI

O Gráfico 13 demonstra a relação que existe entre o rácio AGP/Alb e a classificação SDAI, tendo-se verificado uma correlação positiva moderada estatisticamente significativa com um valor de  $p=0,03$  (Tabela 14).

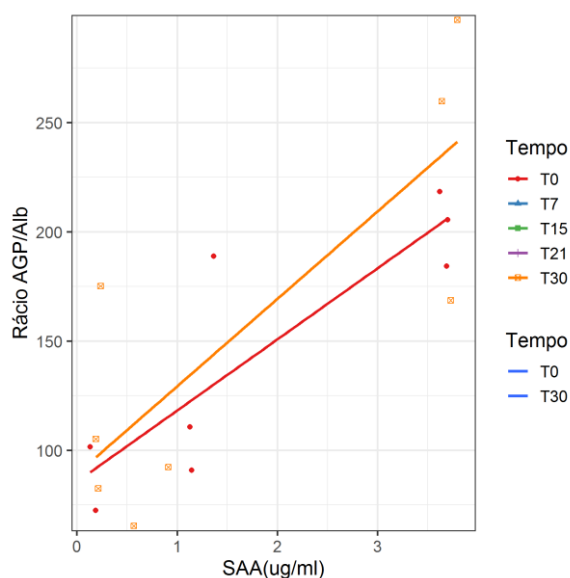
**Gráfico 13 - Representação gráfica da correlação entre o Rácio AGP/Alb e a classificação SDAI.**



#### 4.8. Correlação entre o Rácio AGP/Alb e a SAA

Através do coeficiente de correlação de Spearman, verificou-se uma correlação positiva forte entre os valores do rácio AGP/Alb e a concentração de SAA, estatisticamente significativa ( $p=0,002$ ), representada pelo Gráfico 14 e Tabela 14.

**Gráfico 14 - Representação gráfica da correlação entre o Rácio AGP/Alb e a concentração de SAA.**





**Tabela 14 - Correlação entre a concentração das proteínas e o SDAI, entre o Rácio AGP/Alb e o SDAI, e entre a SAA e o Rácio AGP/Alb.**

COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN		
	Rho	Valor p
<b>AGP-SDAI</b>	0,508	<b>0,044</b>
<b>SAA-SDAI</b>	0,724	<b>0,002</b>
<b>Albumina-SDAI</b>	-0,202	0,453
<b>Rácio AGP/Alb-SDAI</b>	0,551	<b>0,027</b>
<b>Rácio AGP/Alb-SAA</b>	0,729	<b>0,002</b>

AGP – alfa-1 glicoproteína ácida; SAA – proteína sérica amilóide A; Alb – albumina; Rácio AGP/Alb – rácio entre a alfa-1 glicoproteína ácida e a albumina; Rho: coeficiente de correlação; a negrito os valores de  $p < 0,05$  (resultado estatisticamente significativo).

## 5. Discussão

A presente dissertação de mestrado pretendeu testar a hipótese de que o CBD, um fitocanabinoide com propriedades analgésicas e possivelmente anti-inflamatórias (Brutlag and Hommerding 2018, Fraguas-Sánchez and Torres-Suárez 2018, Corsato et al. 2023), tem a capacidade de reduzir a inflamação sistémica através da medição de três proteínas de fase aguda (AGP, SAA e albumina) em gatos com GECF, refratários a outros tratamentos.

Para testar esta hipótese, foi realizado um estudo prospetivo randomizado, duplamente cego, controlado por placebo. Para a inclusão no estudo, e avaliar o CBD como uma substância adjuvante ao tratamento desta doença, os gatos foram previamente diagnosticados com GECF tendo já realizado extrações dentárias parciais - no qual são extraídos todos os dentes pré-molares e molares, ou totais, há pelo menos 3 meses. Este período foi definido com base na literatura conhecida como o período a partir do qual se consegue efetivamente verificar benefícios da extração dentária no controlo dos sinais clínicos da GECF (Lee et al. 2020). Não foi realizada a distinção de que tipo de extração foi realizada para os animais incluídos neste estudo. A razão para esta escolha deveu-se a evitar uma maior limitação dos casos a incluir, e também porque não existe evidência na literatura de diferença na resposta clínica em gatos submetidos a extrações totais ou extrações parciais (Jennings et al. 2015, Silva et al. 2021). A definição de refratabilidade a tratamentos prévios resultou da informação contida nos registos clínicos ou da procura por parte de referência de outros colegas de casos com história similar. Neste caso, seria refratário o animal no qual se verificou ausência de resposta clínica a outros tratamentos ensaiados, no período de 3 meses ou mais após a realização das extrações dentárias, e quando, na descontinuidade do

tratamento em curso, se verificou uma agudização dos sinais. Neste estudo foram incluídos gatos positivos para o retrovírus FIV mas negativos para o retrovírus FeLV. Esta escolha também resultou da atual evidência científica no qual gatos com diagnóstico de FIV não evidenciaram diferenças significativas quanto à resposta ao tratamento, comparativamente a gatos FIV e FeLV negativos, enquanto FeLV positivos mostraram uma tendência maior para o aparecimento de úlceras da língua e, conseqüentemente, para um pior prognóstico (Silva et al. 2021).

Os animais foram divididos em dois grupos, o grupo CBD e grupo PLAC. Foi fornecido ao grupo CBD uma formulação em óleo composta por óleos vegetais, antioxidante natural, aromatizante e CBD, este último numa concentração de 30 mg/ml. Ao grupo PLAC foi fornecida uma formulação idêntica em composição e aspeto, mas sem a substância em estudo. Isto permitiu que, nem o autor a executar as reavaliações, nem o detentor, tivessem conhecimento de que formulação estava a ser administrada ao animal e, desta forma, evitar um viés na observação. Cada frasco possuía um código que o identificava como contendo o CBD ou não, de forma a ser realizada a distinção aquando do término do estudo.

A amostra em estudo foi composta, totalmente, por gatos sem raça definida, o que exclui a interferência da raça nesta avaliação, embora se desconheça qualquer predisposição racial para a ocorrência desta doença (Peralta and Carney 2019). A maioria dos animais em estudo foram do sexo masculino (75%), sendo esta discrepância considerada resultado do acaso e da reduzida amostra. Healey et al. (2007), não observou uma diferença significativa da prevalência de GECF entre fêmeas e machos. A média de idades da amostra foi de 8,8 anos (7 anos no grupo CBD e 10,5 anos no grupo PLAC), compreendidas entre os 4 e os 9 anos, com a exceção de um caso no grupo PLAC com 17 anos, mas sem outras comorbilidades. Estes valores corroboram a prevalência observada, principalmente, em gatos adultos, de idade média de 8 anos, por Healey et al. (2007). Em cada grupo, um gato possuía teste positivo para o FIV, mas não se considerou o envolvimento deste estado infeccioso na resposta ao tratamento. Um dos fatores de risco para a GECF é o contacto com outros animais e acesso ao exterior, o que aumenta os níveis de stress e a probabilidade de exposição a organismos infecciosos (Peralta and Carney 2019, Hussain et al. 2021). Dos 8 gatos em estudo, 5 coabitavam com dois ou mais gatos, dos quais 3 tinham acesso ao exterior, o que apoia a noção de que a prevalência de GECF está relacionada com o número de animais coabitantes.

### **5.1. Efeito do CBD**

O peso dos animais foi registado em todas as reavaliações, no entanto, apesar das ligeiras oscilações em ambos os grupos, não se verificou uma variação significativa ao longo do tempo, nem entre grupos - 20 gramas no grupo CBD e 50 gramas no grupo PLAC. Ao dia

15, verificou-se um aumento estatisticamente significativo do peso no tempo, independentemente do grupo a que pertenciam. Embora o grupo CBD tivesse apresentado uma média de peso superior à do grupo PLAC, esta diferença foi fruto do acaso e, como tal, as variações entre grupos não permitem concluir sobre qualquer efeito benéfico do CBD no peso. Seria expectável que, pelas suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, os gatos do grupo CBD estivessem em melhores condições para ingerir alimento e consequentemente aumentar o peso. Esta ausência de efeito pode resultar do reduzido tamanho da amostra e do facto de o balanço do peso depender de outros fatores com influência na sua evolução, nomeadamente, peso inicial, diferentes níveis de gravidade da doença (SDAI), ou mesmo balanças diferentes (ainda que muito semelhantes). Dois gatos do grupo CBD faltaram a uma das reavaliações semanais por indisponibilidade do detentor, um ao dia 21 e outro ao dia 15, logo, não foi registado o seu peso nessa semana.

A classificação SDAI é um método que permite classificar a gravidade da GECF de cada animal, ao longo do tempo. Para tal, é registado o peso e realizados dois inquéritos - um direcionado ao detentor acerca do estado anímico do animal, e um direcionado ao clínico. O último engloba o peso, comparativamente à última visita, a avaliação do detentor, e a avaliação do clínico acerca do nível de inflamação em cada região da cavidade oral, pontuada de 0 a 3 (Reiter et al. 2019). Todas as semanas, os detentores responderam ao inquérito e o autor executou o registo fotográfico da cavidade oral de todos os gatos para auxiliar na classificação da inflamação. Os dois gatos que faltaram às reavaliações mencionados anteriormente, e não registaram o peso, também não têm registo da sua classificação SDAI nas semanas correspondentes.

As variações de SDAI em ambos os grupos não foram estatisticamente significativas - de 11,8 para 11,3 no grupo CBD e de 16,2 para 15,9 no grupo PLAC, ainda que mostrassem uma tendência negativa para ambos os grupos. No entanto, observou-se um efeito significativo no grupo CBD aos dias 7 e 15, com coeficiente positivo, o que indica um aumento da gravidade da doença nas primeiras duas semanas. Esta observação pode ter várias interpretações. Uma hipótese relaciona-se com a dificuldade em administrar o produto oralmente, cuja administração forçada pode ter aumentado o stress dos animais e conduzir indiretamente ao agravamento temporário da doença (Peralta and Carney 2019, Reiter et al. 2019, Lee et al. 2020). Outra hipótese reside na formulação propriamente dita e nos efeitos do CBD. Este pode não ser, de facto, eficaz na redução dos sinais clínicos, seja por a dose estudada não ser suficiente ou a formulação não permitir uma absorção eficaz da substância ativa. A formulação em óleo foi estudada anteriormente em gatos e encontra-se associada a alguma variabilidade individual (Deabold et al. 2019, Coelho et al. 2023). Esta variabilidade individual pode ter contribuído para estes resultados, uma vez que a amostra foi muito

reduzida, com classificações SDAI díspares entre indivíduos e entre grupos. Não foi possível emparelhar os grupos com base na gravidade da doença, o que foi uma limitação, mais adiante discutida. Seria interessante estudar e compreender em que medida o CBD será benéfico de acordo com a gravidade do quadro clínico. Seria expectável observar algum efeito do CBD, uma vez que recetores canabinoides, principalmente recetores CB2, apresentaram uma sobreexpressão na mucosa oral de gatos com GECF, comparativamente a gatos saudáveis (Polidoro et al. 2021).

A AGP é uma proteína de fase aguda positiva cuja concentração aumenta na presença de inflamação sistémica e outras lesões teciduais (Correa et al. 2001, Thalmeier et al. 2023). Em gatos doentes, Kann et al. (2012) doseou concentrações de 220 µg/ml a 3210 µg/ml. Nos gatos com linfoma, Correa et al. (2001) observaram uma concentração média de 460 µg/ml e Winkel et al. (2015) uma média de 832,6 µg/ml (50 µg/ml - 2825,4 µg/ml). No entanto, estes estudos optaram por métodos de doseamento de AGP diferentes. Neste estudo, a concentração média de AGP obtida foi de 477,1 µg/ml ao dia 0 e 545,8 µg/ml no dia 30, verificando-se no global (n=8) um aumento significativo independente do grupo, e semelhante ao anteriormente descrito (Mestrinho et al., 2020). No grupo CBD, a média de AGP diminuiu de forma significativa ao longo do tempo, e com um coeficiente negativo de -179,5 (Tabela 11), o que indica que a concentração de AGP reduziu, em média, 179,5 µg/ml no grupo medicado com CBD, suportando a hipótese de que o CBD poderá ter um efeito anti-inflamatório na GECF. No grupo PLAC, a média aumentou de 562,5 µg/ml para 720,9 µg/ml, o que reforça o efeito benéfico do CBD na redução desta proteína de fase aguda. Também sugere que o excipiente usado, igual para ambas as formulações (óleos vegetais e aromatizante) não contribuiu para potenciar o efeito do CBD. Os óleos vegetais são ricos em ácidos gordos polinsaturados e, dependendo da sua composição em ómega-3 e outros componentes, têm sido associados a alguns efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (Ruiz et al. 2017).

Para a medição da SAA através do método ELISA, foram realizadas diluições seriadas para concluir qual a diluição mais indicada para englobar as concentrações dos gatos em estudo. Num trabalho de Ramalho (2019), os valores obtidos com a diluição inicial aconselhada pelo protocolo verificaram-se demasiado elevados para obter leituras de absorvância no espectrofotómetro. No momento de elaboração desta dissertação, baseado na literatura investigada, poucos estudos indicavam concentrações médias de SAA em gatos com GECF (Yuki et al. 2020). Assim, através da execução das várias diluições, concluiu-se que o fator de diluição de 250 vezes era o mais indicado para englobar tanto as concentrações mais baixas como as mais elevadas de SAA dos gatos em estudo (Tabela 7). Uma limitação semelhante ocorreu na medição de AGP num trabalho de Mestrinho et al. (2020). Um estudo

recente testou o kit usado para a presente dissertação e concluiu que o fator de diluição inicial recomendado não abrangia os valores de algumas amostras e aconselhou o uso de um fator de diluição de  $3,2 \times 10^4$  vezes (Thalmeier et al. 2023). Desta forma, os autores optaram por esse mesmo fator para a medição da AGP.

Acerca dos valores de concentração propriamente ditos, a SAA, também uma PFA positiva e das mais importantes em gatos pela sua rápida resposta em variadas doenças (Escribano et al. 2021, Rossi 2023), mostrou uma tendência semelhante à verificada na AGP. Esta observação é, portanto, expectável, visto que uma correlação positiva entre estas proteínas já teria sido relatada por Kajikawa et al. (1999). A média de SAA é significativamente superior em gatos doentes tais como linfoma ou mesmo GECE (Kann et al. 2012, Winkel et al. 2015, Yuki et al. 2020). Nos gatos com gengivoestomatite, a média obtida neste estudo encontrou-se dentro do intervalo de valores anteriormente publicado - uma média de 1,3  $\mu\text{g/ml}$ , com intervalo entre 0  $\mu\text{g/ml}$  e 52,8  $\mu\text{g/ml}$  (Yuki et al. 2020). Também para a concentração de SAA, verificou-se uma redução significativa, em média, ao longo do tempo, no grupo CBD, com um coeficiente negativo de -0,528 (Tabela 11). Ao contrário, no grupo PLAC, a média da concentração de SAA aumentou de 2,79  $\mu\text{g/ml}$  para 2,84  $\mu\text{g/ml}$ . À semelhança do observado na AGP, estes resultados indicam que o CBD pode levar a uma redução da inflamação sistémica e, nos casos sem medicação (grupo PLAC), esta teve tendência a aumentar, novamente, validando a ausência de efeito anti-inflamatório da formulação excipiente.

A albumina, contrariamente às últimas duas PFA, tem tendência a reduzir a sua concentração em resposta à lesão tecidual (Paltrinieri 2008, Cray et al. 2009). A concentração obtida desta proteína encontrou-se dentro dos valores de referência (3,1 g/dl - 4,3 g/dl) em todos os casos exceto num dos animais do grupo PLAC, que se encontrava abaixo do intervalo de referência. Ainda, num animal do grupo PLAC e num do grupo CBD, a concentração de albumina encontrava-se no limite inferior. Em ambos os grupos, verificou-se um aumento da concentração média desta proteína, ainda que sem significado estatístico quer na interação do grupo com o tempo, quer entre grupos, embora se tenha observado uma redução da sua concentração ligeira em 2 casos, num animal de cada grupo, ao contrário do observado na tendência geral. Estes resultados não permitem concluir sobre qualquer efeito do CBD nesta proteína. Esta ausência de alterações pode ser resultado de outros fatores que poderão contribuir para as alterações da albumina, limitando a sua sensibilidade como marcador de inflamação (Mitchell et al. 2009). O seu tempo de semivida são de 20 dias e não responde tão rapidamente à inflamação, pois depende do desvio do metabolismo hepático aquando da produção de proteínas de fase aguda. Adicionalmente, a sua distribuição é também um fator importante a considerar uma vez que muda rapidamente entre os

compartimentos intra e extravasculares numa tentativa de equilibrar a distribuição global de albumina (Roche et al. 2008).

Para além da medição das três proteínas mencionadas, foi também calculado um rácio com base nas concentrações de AGP e albumina, uma PFA positiva lenta e uma PFA negativa lenta, respetivamente. Idealmente, o rácio deveria ser calculado com quatro proteínas (uma positiva rápida, uma positiva lenta, uma negativa rápida e uma negativa lenta) (Gruys et al. 2006, Rossi 2023), no entanto, por limitações económicas, o autor apenas realizou medições a três proteínas e calculou o rácio entre as proteínas lentas em estudo. Mitchell et al. (2009) testaram o mesmo rácio em cães com anemia hemolítica imunomediada, em conjunto com as proteínas isoladas, embora não tenha encontrado associações significativas com as variáveis que estudou - o tempo de hospitalização dos animais, a mortalidade, entre outras. Os rácios entre proteínas de fase aguda são apontados como possíveis fatores de prognóstico ainda em estudo quer em medicina humana quer em veterinária (Gruys et al. 2006, Mitchell et al. 2009). Neste trabalho, o rácio AGP/albumina poderá ser aplicável como marcador de inflamação, relacionando-se com a gravidade da doença, que será discutido posteriormente.

Uma vez que a AGP tem tendência a reduzir com a diminuição da inflamação e a albumina tem tendência a aumentar, é de esperar que o rácio reduza aquando do decréscimo da inflamação. Ao longo do tempo, independentemente do grupo, observou-se um aumento significativo do rácio com  $p=0,002$ . No grupo CBD, o rácio AGP/Alb reduziu do dia 0 para o dia 30, cuja interação do grupo com o tempo teve um coeficiente negativo de -42,1 e um resultado estatisticamente significativo (Tabela 11). No grupo PLAC, o rácio aumentou, em média, 30,2 unidades (Tabela 10). Estes valores indicam que o CBD teve um efeito significativo na redução do rácio e, conseqüentemente, na redução da inflamação.

Todos os sinais clínicos que os detentores observaram durante o período de 30 dias desta avaliação, e que não ocorriam antes da inclusão no estudo, foram considerados efeitos adversos da administração da formulação. Os efeitos adversos do CBD mencionados na literatura são principalmente gastrointestinais, sonolência, alteração de apetite (Fraguas-Sánchez and Torres-Suárez 2018, Souza et al. 2022, Corsato et al. 2023), e alterações de bioquímicas hepáticas (Gamble et al. 2018, Deabold et al. 2019). Destes, os efeitos relatados no grupo CBD foram sonolência e fezes moles num único caso. A sonolência permaneceu durante os 30 dias, enquanto as fezes moles apenas ocorreram na primeira semana. No grupo PLAC, um detentor também descreveu maior sonolência do que o habitual nas últimas três semanas do estudo. Dos 4 gatos submetidos à substância, apenas um demonstrou sinais ligeiros, o que apoia a noção de que o CBD é tolerável e seguro (Kulpa et al. 2021, Coelho et al. 2023), embora seja uma amostra muito pequena para o podermos afirmar com certeza.

Um sinal bastante observado e transversal a quase todos os animais, mas que não podemos considerar como sendo um efeito da ação do CBD, foi o aumento do *stress* após inclusão no estudo. A maioria dos gatos (4 do grupo CBD e 3 do grupo PLAC) demonstrou comportamentos de *stress* como fugir dos detentores e alguma agressividade no momento de serem recolhidos para a transportadora para se dirigirem às reavaliações. Para além desse fator de *stress*, dos 6 gatos que precisaram de administração forçada do óleo (3 do grupo CBD e 3 do grupo PLAC), 5 (3 do grupo CBD e 2 do grupo PLAC) mostraram resistência e fugiam para evitar essa mesma administração. Como mencionado anteriormente, o *stress* é um dos fatores de risco para a GECE e as recorrentes idas ao veterinário, em conjunto com o *stress* diário da administração forçada do óleo, pode ter influenciado os resultados das variáveis estudadas. Desta forma, seria interessante tentar melhorar a palatabilidade deste produto ou alterar a forma de administração, como por exemplo para cápsulas gelatinosas.

Ainda no contexto associado ao *stress* verificado neste período, é relevante referir que a formulação fornecida demonstrou possuir um sabor ou cheiro desagradável, uma vez que a maioria dos animais no estudo (75%, 6/8) se recusou a ingerir a comida dada pelos detentores quando misturada com o óleo. Foi aconselhada a administração do óleo com alimento, uma vez que a sua absorção é maior nessas condições (Birnbaum et al. 2019), no entanto, apenas um animal em cada grupo aceitou ingeri-lo autonomamente com comida. Kulpa et al. (2021) verificaram sinais de aversão ao sabor ou cheiro do CBD, como hipersalivação e abanar a cabeça, no entanto, no presente trabalho, este desagrado observou-se em ambos os grupos, o que sugere uma baixa palatabilidade da formulação em si e não apenas do canabidiol. Esta baixa palatabilidade pode ter contribuído para um aumento do *stress* dos animais uma vez que a sua administração foi maioritariamente forçada, mesmo quando observada aversão.

Para além dos 8 animais recrutados, outros 4 foram incluídos no estudo, porém, a pedido dos detentores ou por reconsideração do autor, foram removidos antes do término do mesmo. Um gato, inicialmente atribuído ao grupo CBD, não tolerava manipulação em consultas e, por demonstrar comportamentos agressivos exacerbados pelo *stress*, impediu as avaliações para o registo da classificação SDAI e obtenção de registos fotográficos. Este caso foi então removido por critério do autor. Dois gatos, também incluídos no grupo CBD, não aceitavam manipulação por parte dos detentores para contenção e administração oral forçada duas vezes ao dia, tendo sido excluídos após a primeira semana. Todos os casos tinham indicação para administrar a formulação com alimento, no entanto, muitos não ingeriam alimento com a presença do óleo e era necessária administração forçada, como se observou nestes 2 casos. Esta mostrou-se uma limitação que será mencionada posteriormente na presente discussão. Por fim, um gato do grupo PLAC teve de ser removido do ensaio clínico

a pedido da detentora, às duas semanas, por exacerbamento dos sinais clínicos mesmo com o resgate analgésico fornecido.

O resgate analgésico fornecido aos detentores foi buprenorfina numa dose de 0,02 mg/kg em SOS, com indicação para administração caso se observasse uma agudização dos sinais clínicos, nomeadamente anorexia e vocalização/agressividade perante a apresentação do alimento. Da totalidade da amostra, apenas um detentor do grupo PLAC teve necessidade de administrar o resgate analgésico. Este realizou 3 tomas da buprenorfina, a primeira ao dia 15, a segunda ao dia 24 e a última ao dia 29. Devido à reduzida amostra, não podemos concluir que a ausência de resgates analgésicos no grupo CBD se deve ao efeito anti-inflamatório do CBD, no entanto, suporta a ideia de que esta substância poderá trazer algum benefício para os gatos que sofrem com esta doença.

## **5.2. Relação das PFA com a gravidade da GECF**

Uma vez que a classificação SDAI avalia o nível de gravidade da GECF, maioritariamente através de parâmetros inflamatórios clínicos, pretendeu-se também testar se existiria alguma associação entre as proteínas em estudo e os valores de SDAI dos animais recrutados. Comparou-se os valores de AGP e SAA com os de SDAI ao dia 0 e dia 30, e ambas mostraram uma correlação positiva estatisticamente significativa com os valores de SDAI. Estes resultados sugerem que existe uma associação significativa entre uma maior concentração das PFA positivas estudadas (representativas da inflamação sistémica) e uma maior gravidade dos sinais de dor oral. A SAA foi a que obteve uma relação mais forte com a gravidade da doença ( $\rho=0,724$ ), enquanto na AGP essa relação foi moderada ( $\rho=0,508$ ) (Tabela 14). A SAA é considerada a maior PFA em gatos, uma vez que responde de forma muito rápida e exacerbada durante a resposta de fase aguda (Yuki et al. 2020, Escribano et al. 2021, Rossi 2023), o que pode justificar a sua maior relação com a classificação SDAI, comparativamente à AGP.

Quanto à concentração de albumina, esta apresentou uma correlação negativa com o SDAI, ou seja, conforme a sua concentração reduziu, o SDAI aumentou. Embora não se tenha verificado significado estatístico, a tendência observada era expectável, considerando a tendência de PFA negativas diminuírem na presença de inflamação. A ausência de associação poderá ser resultado, não só do número reduzido de casos, mas também dos fatores mencionados anteriormente como o facto de ser uma proteína pouco sensível, já se encontrar, maioritariamente, dentro dos valores de referência no início do estudo, e ser uma PFA negativa lenta.

Uma vez que o SDAI é a escala utilizada para pontuar a GECF (Reiter et al. 2019), e a SAA mostrou ter uma relação forte com a mesma, a autora optou também por avaliar a



relação do rácio com o SDAI, testando a aplicabilidade do rácio em avaliar a gravidade da doença. Essa relação foi positiva moderada ( $\rho=0,551$ ) e estatisticamente significativa, concordante com as relações observadas anteriormente. Quanto à relação entre o rácio e a SAA, obteve-se uma relação forte ( $\rho=0,729$ ) estatisticamente significativa. Estudos sugerem que a medição de um conjunto de PFA é mais útil para a deteção de inflamação, comparativamente à medição de uma proteína isolada, visto que estas respondem de forma muito variável na presença de diferentes lesões (Cerón et al. 2005, Kann et al. 2012). Os valores obtidos no presente estudo suportam a ideia de que o rácio tem uma relação positiva com a gravidade da doença, no entanto, impõem-se algumas questões. A proteína SAA isolada demonstrou uma relação mais forte com o SDAI do que o rácio testado, no entanto é um argumento incerto uma vez que a amostra foi muito reduzida. O acesso a kits de ensaio para a medição destas proteínas é limitado e possui custos bastante elevados em medicina veterinária (Kann et al. 2012), o que contesta a vantagem do recurso a este rácio em comparação com a classificação SDAI atualmente usada na avaliação clínica.

### **5.3. Limitações do estudo**

O presente estudo apresentou variadas limitações. Primeiro, a amostra foi muito reduzida, em parte pelo intervalo temporal para a redação da dissertação, limitado no tempo, como pelos critérios de inclusão e exclusão. O facto de o estudo ser duplamente cego conduziu a que muitos detentores se mostrassem hesitantes em descontinuar a medicação atual para entrar num estudo onde existia a possibilidade de o seu animal entrar num grupo que não seria medicado. O facto de não terem conhecimento do grupo onde seriam incluídos também levou alguns detentores a não querer participar. A realização de reavaliações semanais reduziu a amostra para gatos com detentores com disponibilidade para se dirigirem ao HEV-FMV com frequência. O paciente em si, para realizar as múltiplas visitas ao HEV-FMV, carecia de um temperamento dócil para permitir as manipulações e avaliações constantes da cavidade oral, o que levou também à exclusão de alguns casos.

Quanto à classificação SDAI, esta é composta pelo inquérito aos detentores e pela avaliação do clínico observador. O inquérito aos detentores está submetido à subjetividade da pessoa que está a avaliar, podendo ser influenciado pela expectativa de cada detentor. Alguns casos admitiram, após inclusão no estudo, estarem mais atentos às questões colocadas e não saber distinguir se o que estavam a relatar era, de facto, algo novo. Para além disso, o questionário é referente ao estado do animal pré-doença, e alguns detentores não tinham termo de comparação para responder ao inquérito, uma vez que adotaram o animal já com a doença presente. A avaliação clínica foi realizada sempre pelo mesmo observador e com a supervisão do mesmo clínico, no entanto, está sempre presente alguma

subjetividade. Ainda relativamente à classificação SDAI, não foi possível emparelhar casos e controlos de acordo com o seu nível de gravidade e, como tal, verificou-se uma diferença quase significativa de gravidade de sinais clínicos entre casos e controlos. Esta diferença dificultou a apreciação do efeito que se pretendia observar e, desta forma, seria importante um emparelhamento da amostra por classificação SDAI em estudos futuros.

Acerca da administração da formulação, parte dos animais ingeriram o CBD com comida, enquanto outros ingeriram sem alimento, o que pode alterar a absorção do mesmo e o seu efeito nos parâmetros avaliados. Desta forma, seria interessante realizar um estudo semelhante com exatamente as mesmas condições de administração do óleo, num maior número de indivíduos.

## **6. Conclusões**

A presente dissertação apresenta resultados muito preliminares, mas significativos, permitindo sugerir que a administração de uma formulação contendo CBD na dose de 2 mg/kg de 12 em 12h, durante 30 dias, contribuiu para a redução da inflamação sistémica através do doseamento das concentrações de AGP e SAA. Estes resultados sugerem um efeito anti-inflamatório benéfico do CBD para animais que, mesmo após extrações dentárias, sofrem de GECF. Reforçou também a ideia de que a SAA, a AGP e o rácio AGP/Alb são bons indicadores de inflamação sistémica, positivamente associados à gravidade da doença.

Por fim, salienta-se o elevado interesse científico em continuar a investigação do CBD como adjuvante terapêutico de gatos com GECF refratários a outros tratamentos, através da realização de mais estudos e com um número de casos mais representativo.

## BIBLIOGRAFIA

Arzi B, Peralta S, Fiani N, Vapniarsky N, Taechangam N, Delatorre U, Clark KC, Walker NJ, Loscar MR, Lommer MJ, et al. 2020. A multicenter experience using adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for cats with chronic, non-responsive gingivostomatitis. *Stem Cell Res Ther.* 11(1). p. 1–13.

ASAE. 2021. É possível o uso de Cânhamo (*Cannabis sativa*) e/ou CBD (canabidiol) em Alimentos? *ASAEnews*, 124. [acedido 2023 Jul 1]. <https://www.asae.gov.pt/newsletter2/asaenews-n-124-novembro-2021/uso.aspx>

Bazzano M, Marchegiani A, Troisi A, McLean A, Laus F. 2022. Serum Amyloid A as a Promising Biomarker in Domestic Animals' Reproduction: Current Knowledge and Future Perspective. *Animals.* 12(5). p. 1-11.

Birnbaum AK, Karanam A, Marino SE, Barkley CM, Remmel RP, Roslawski M, Gramling-Aden M, Leppik IE. 2019. Food effect on pharmacokinetics of cannabidiol oral capsules in adult patients with refractory epilepsy. *Epilepsia.* 60(8). p. 1586–1592.

Britch SC, Goodman AG, Wiley JL, Pondelick AM, Craft RM. 2020. Antinociceptive and immune effects of delta-9-tetrahydrocannabinol or cannabidiol in male versus female rats with persistent inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther.* 373(3). p. 416–428.

Brutlag A, Hommerding H. 2018. Toxicology of Marijuana, Synthetic Cannabinoids, and Cannabidiol in Dogs and Cats. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 48(6). p. 1087–1102.

Cannon M. 2015. Feline chronic gingivostomatitis. *Companion animal.* 20(11). p. 616-623.

Cerón JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S. 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: Current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol.* 34(2). p. 85–99.

Coelho JC, Duarte N, Bento da Silva A, Bronze M do R, Mestrinho LA. 2023. Placebo-Controlled Trial of Daily Oral Cannabidiol as Adjunctive Treatment for Cats with Chronic Gingivostomatitis. *Animals.* 13(17). p. 1–11.

Correa SS, Mauldin GN, Mauldin GE, Mooney SC. 2001. Serum alpha 1-acid glycoprotein concentration in cats with lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc.* 37(2). p. 153–158.

Corsato Alvarenga I, Panickar KS, Hess H, McGrath S. 2023. Scientific Validation of Cannabidiol for Management of Dog and Cat Diseases. *Annu Rev Anim Biosci.* 11. p. 227–246.

Cray C, Zaias J, Altman NH. 2009. Acute phase response in animals: A review. *Comp Med.* 59(6). p. 517–526.

Crippa JA, Guimarães FS, Campos AC, Zuardi AW. 2018. Translational investigation of the therapeutic potential of cannabidiol (CBD): Toward a new age. *Front Immunol.* 9. p. 1–16.

De Briyne N, Holmes D, Sandler I, Stiles E, Szymanski D, Moody S, Neumann S, Anadón A. 2021. Cannabis, cannabidiol oils and tetrahydrocannabinol—what do veterinarians need to know? *Animals.* 11(3). p. 1–19.

Deabold KA, Schwark WS, Wolf L, Wakshlag JJ. 2019. Safety Assessment with Use of CBD-Rich Hemp Nutraceutical in Healthy Dogs and Cats. *Animals*. 9(10). p. 1–13.

De Simone G, Di Masi A, Ascenzi P. 2021. Serum albumin: A multifaced enzyme. *Int J Mol Sci*. 22(18). p. 1–23.

Dolieslager SMJ, Riggio MP, Lennon A, LPFAin DF, Johnston N, Taylor D, Bennett D. 2011. Identification of bacteria associated with feline chronic gingivostomatitis using culture-dependent and culture-independent methods. *Vet Microbiol*. 148(1). p. 93–98.

Eckersall PD, Bell R. 2010. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J*. 185(1). p. 23–27.

Ehltng C, Wolf SD, Bode JG. 2021. Acute-phase protein synthesis: A key feature of innate immune functions of the liver. *Biol Chem*. 402(9). p. 1129–1145.

Escribano D, Bustillo AO, Marín LP, Rabasco AN, Herrera PR, Cerón JJ, Tvarijonaviciute A. 2021. Analytical validation of two point-of-care assays for serum amyloid a measurements in cats. *Animals*. 11(9). p. 1-7.

Ewing LE, Skinner CM, Quick CM, Kennon-McGill S, McGill MR, Walker LA, ElSohly MA, Gurley BJ, Koturbash I. 2019. Hepatotoxicity of a Cannabidiol-rich cannabis extract in the mouse model. *Molecules*. 24(9). p. 1–17.

Febre M, Saulnier N, Roux P, Boutoille F, Girard N, Robert C, Rakic R, Rosset E, Maddens S. 2022. Placenta-derived mesenchymal stromal cells as a treatment for refractory chronic gingivostomatitis in cats: eight cases (2018). *J Small Anim Pract*. p. 1-10

Ferri F, Ferro S, Porporato F, Callegari C, Guglielmetti C, Mazza M, Ferrero M, Crinò C, Gallo E, Drigo M, et al. 2023. AA-amyloidosis in cats (*Felis catus*) housed in shelters. *PLoS One*. 18(3). p. 1–14.

Fournier T, Medjoubi-n N, Porquet D. 2000. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1482. p. 157-171.

Fraguas-Sánchez AI, Torres-Suárez AI. 2018. *Medical Use of Cannabinoids*. Springer International Publishing. p. 1665—1703.

Gamble LJ, Boesch JM, Frye CW, Schwark WS, Mann S, Wolfe L, Brown H, Berthelsen ES, Wakshlag JJ. 2018. Pharmacokinetics, Safety, and Clinical Efficacy of Cannabidiol Treatment in Osteoarthritic Dogs. *Front Vet Sci*. 5(165). p. 1–9.

Gollaher C, Bausserman L. 1990. Hepatic Catabolism of Serum Amyloid A during an Acute Phase Response and Chronic Inflammation. *Experimental Biology and Medicine*, 194. p. 245– 250.

Greb A, Puschner B. 2018. Cannabinoid treats as adjunctive therapy for pets: gaps in our knowledge. *Toxicol Commun*. 2(1). p. 10–14.

Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ, van Dijk E, Melen RH. 2006. Monitoring health by values of acute phase proteins. *Acta Histochem*. 108(3) p. 229–232.

Harley R, Gruffydd-Jones TJ, Day MJ. 2003. Salivary and serum immunoglobulin levels in cats with chronic gingivostomatitis. *Vet Rec.* 152(5). p. 125–129.

Healey KAE, Dawson S, Burrow R, Cripps P, Gaskell CJ, Hart CA, Pinchbeck GL, Radford AD, Gaskell RM. 2007. Prevalence of feline chronic gingivo-stomatitis in first opinion veterinary practice. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* 9(5). p. 373–381.

Hennet PR, Camy GAL, McGahie DM, Albouy M v. 2011. Comparative efficacy of a recombinant feline interferon omega in refractory cases of calicivirus-positive cats with caudal stomatitis: A randomised, multi-centre, controlled, double-blind study in 39 cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* 13(8). p. 577–587.

Hochepped T, Berger FG, Baumann H, Libert C. 2003.  $\alpha$ 1-acid glycoprotein: An acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14(1). p. 25–34.

Hussain Haidary M, Radzi R, Waseem Aslam M, Fong Lau S, Mustaffa Kamal F, Rasul Radzali A. 2021. Retrospective Study of Clinical Manifestations and Multiple Treatment Outcomes in 57 Cats Diagnosed with Feline Chronic Gingivostomatitis. *J Anim Heal Prod.* 10(1). p. 51-59

Iffland K, Grotenhermen F. 2017. An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A Review of Clinical Data and Relevant Animal Studies. *Cannabis cannabinoid Res.* 2(1). p. 139–154.

Infarmed. 2019. Canábis para fins medicinais. [acedido 2023 Jul 1]. <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/canabis-medicinal>

Jain S, Gautam V, Naseem S. 2011. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci.* 3(1). p. 118–127.

Jennings MW, Lewis JR, Soltero-rivera MM, Brown DC, Reiter AM. 2015. Effect of tooth extraction on stomatitis in cats: 95 cases (2000–2013). *246(6).* p. 654-660.

Jukier T, Cruz-Espindola C, Martin D, Boothe DM. 2023. Disposition of a single oral dose of a cannabidiol medication in healthy cats. *Front Vet Sci.* 10(16). p. 1-8.

Kajikawa T, Furuta A, Onishi T, Tajima T, Sugii S. 1999. Changes in concentrations of serum amyloid a protein,  $\alpha$ 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. *Vet Immunol Immunopathol.* 68(1). p. 91–98.

Kann RKC, Seddon JM, Henning J, Meers J. 2012. Acute phase proteins in healthy and sick cats. *Res Vet Sci.* 93(2). p. 649–654.

Kim DH, Kwak HH, Woo HM. 2023. Prevalence of feline chronic gingivostomatitis in feral cats and its risk factors. *J Feline Med Surg.* 25(1). p. 1-7.

Kisilevsky R, Manley PN. 2012. Acute-phase serum amyloid A: Perspectives on its physiological and pathological roles. *Amyloid.* 19(1). p. 5–14.

Kulpa JE, Paulionis LJ, Eglit GML, Vaughn DM. 2021. Safety and tolerability of escalating cannabinoid doses in healthy cats. *J Feline Med Surg.* 23(12). p. 1162–1175.

Landa L, Sulcova A, Gbelec P. 2016. The use of cannabinoids in animals and therapeutic implications for veterinary medicine: A review. *Vet Med (Praha)*. 61(3). p. 111–122.

Lee DB, Verstraete FJM, Arzi B. 2020. An Update on Feline Chronic Gingivostomatitis. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract*. 50(5). p. 973–982.

Lemmons M, Beebe D. 2019. Oral anatomy and physiology. In: Lobprise HB, Dodd JR (Bert), editors. *Wigg's Veterinary Dentistry - Principles and Practice*. Second Edition. John Wiley & Sons. p. 1–24.

Lommer MJ. 2013. Efficacy of cyclosporine for chronic, refractory stomatitis in cats: A randomized, placebo-controlled, double-blinded clinical study. *J Vet Dent*. 30(1). p. 8–17.

Lommer MJ, Verstraete FJM. 2003. Concurrent oral shedding of feline calicivirus and feline herpesvirus 1 in cats with chronic gingivostomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 18(2). p. 131–134.

Machado Bergamaschi M, Helena Costa Queiroz R, Waldo Zuardi A, Alexandre S. Crippa J. 2011. Safety and Side Effects of Cannabidiol, a Cannabis sativa Constituent. *Curr Drug Saf*. 6(4). p. 237–249.

Mestrinho L, Castejón A, Gordo I, Serrano M, Requicha J, Velázquez I, Niza MR. 2015. *Estomatologia do Gato*. 1a edição. Companhia Portuguesa Consumer Health, Lda.

Mestrinho LA, Rosa R, Ramalho P, Branco V, Iglésias L, Pissarra H, Duarte A, Niza M. 2020. A pilot study to evaluate the serum Alpha-1 acid glycoprotein response in cats suffering from feline chronic gingivostomatitis. *BMC Vet Res*. 16(1). p. 1–9.

Miragliotta V, Ricci PL, Albanese F, Pirone A, Tognotti D, Abramo F. 2018. Cannabinoid receptor types 1 and 2 and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ : distribution in the skin of clinically healthy cats and cats with hypersensitivity dermatitis. *Vet Dermatol*. 29(4). p. 316–321.

Miranda-Cortés A, Mota-Rojas D, Crosignani-Outeda N, Casas-Alvarado A, Martínez-Burnes J, Olmos-Hernández A, Mora-Medina P, Verduzco-Mendoza A, Hernández-Ávalos I. 2023. The role of cannabinoids in pain modulation in companion animals. *Front Vet Sci*. 9. p. 1-15.

Mitchell KD, Kruth SA, Wood RD, Jefferson B. 2009. Serum Acute Phase Protein Concentrations in Dogs with Autoimmune Hemolytic Anemia. *J Vet Intern Med*. 23. p. 585-591.

Mlost J, Bryk M, Starowicz K. 2020. Cannabidiol for pain treatment: Focus on pharmacology and mechanism of action. *Int J Mol Sci*. 21(22). p. 1–22.

Moore AR, Avery PR. 2019. Protein characterization using electrophoresis and immunofixation; a case-based review of dogs and cats. *Vet Clin Pathol*. 48(1). p. 29–44.

Naidenko S V., Alekseeva GS, Klyuchnikova PS, Erofeeva MN. 2022. Changes in Serum Amyloid A Level in Domestic Cats during Pregnancy. *Dokl Biol Sci*. 507(1). p. 269–271.

Ożarowski M, Karpiński TM, Zielińska A, Souto EB, Wielgus K. 2021. Cannabidiol in neurological and neoplastic diseases: Latest developments on the molecular mechanism of action. *Int J Mol Sci*. 22(9). p. 1-18

- Paltrinieri S. 2008. The feline acute phase reaction. *Vet J.* 177(1). p. 26–35.
- Paltrinieri S, Metzger C, Battilani M, Pocacqua V, Gelain ME, Giordano A. 2007. Serum  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (AGP) concentration in non-symptomatic cats with feline coronavirus (FCoV) infection. *J Feline Med Surg.* 9(4). p. 271–277.
- Peralta S, Carney PC. 2019. Feline chronic gingivostomatitis is more prevalent in shared households and its risk correlates with the number of cohabiting cats. *J Feline Med Surg.* 21(12). p. 1165–1171.
- Polidoro G, Galiazzo G, Giancola F, Papadimitriou S, Kouki M, Sabattini S, Rigillo A, Chiocchetti R. 2021. Expression of cannabinoid and cannabinoid-related receptors in the oral mucosa of healthy cats and cats with chronic gingivostomatitis. *J Feline Med Surg.* 23(8). p. 679–691.
- Ramalho, PC. 2019. O papel da proteína amilóide A sérica como fator de prognóstico na gengivoestomatite crónica no gato. Dissertação de Mestrado Integrado de Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Reiter AM, Johnston N, Anderson JG, Soltero-Rivera MM, Lobprise HB. 2019. Domestic Feline Oral Dental Diseases. In: Lobprise HB, Dodd JR (Bert), editors. *Wiggs's Vet Dentistry: Principles and Practice. Second Edition.* John Wiley and Sons. p. 446–453.
- Rieder SA, Chauhan A, Singh U, Nagarkatti M, Nagarkatti P. 2010. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology.* 215(8). p. 598–605.
- Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. 2008. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 582(13). p. 1783–1787.
- Rosa RM, Mestrinho LAP. 2019. Acute phase proteins in cats. *Cienc Rural.* 49(4). p. 1-8.
- Rossi G. 2023. Acute phase proteins in cats: Diagnostic and prognostic role, future directions, and analytical challenges. *Vet Clin Pathol.* 52(1). p. 37–49.
- Rossi G, Meazzi S, Giordano A, Paltrinieri S. 2020. Serum paraoxonase 1 activity in cats: analytical validation, reference intervals, and correlation with serum amyloid A and alpha-1-acid glycoprotein. *J Vet Diagnostic Investig.* 32(6). p. 844–855.
- Rozental AJ, Gustafson DL, Kusick BR, Bartner LR, Castro SC, McGrath S. 2023. Pharmacokinetics of escalating single-dose administration of cannabidiol to cats. *J Vet Pharmacol Ther.* 46(1). p. 25–33.
- Ruiz Ruiz JC, Ortiz Vazquez EDLL, Segura Campos MR. 2017. Encapsulation of vegetable oils as source of omega-3 fatty acids for enriched functional foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 57(7). p. 1423–1434.
- Sack GH. 2018. Serum amyloid A - A review. *Mol Med.* 24(1). p. 1–27.
- Schreiber S. 1988. Special Articles Serum Albumin. *Liver.* 8(2). p. 385–401.

Selting KA, Ogilvie GK, Lana SE, Fettman MJ, Mitchener KL, Hansen RA, Richardson KL, Walton JA, Scherk MA. 2000. Serum alpha 1-acid glycoprotein concentrations in healthy and tumor-bearing cats. *J Vet Intern Med.* 14(5). p. 503–506.

Sheinenzon A, Shehadeh M, Michelis R, Shaoul E, Ronen O. 2021. Serum albumin levels and inflammation. *Int J Biol Macromol.* 184. p. 857–862.

Silva M, Fernandes M, Fialho M, Mestrinho L. 2021. A case series analysis of dental extractions' outcome in cats with chronic gingivostomatitis carrying retroviral disease. *Animals.* 11(11). p. 1-13.

Silver RJ. 2019. The endocannabinoid system of animals. *Animals.* 9(9). p. 1-15.

Souza JDR, Pacheco JC, Rossi GN, de-Paulo BO, Zuardi AW, Guimarães FS, Hallak JEC, Crippa JA, Dos Santos RG. 2022. Adverse Effects of Oral Cannabidiol: An Updated Systematic Review of Randomized Controlled Trials (2020–2022). *Pharmaceutics.* 14(12). p. 1–14.

Tamamoto T, Ohno K, Takahashi M, Nakashima K, Fujino Y, Tsujimoto H. 2013. Serum amyloid A as a prognostic marker in cats with various diseases. *J Vet Diagnostic Investig.* 25(3). p. 428–432.

Thalmeier S, Güssow A, Häuser MK, Bauer N, Hazuchova K. 2023. Cat alpha-1-acid glycoprotein enzyme-linked immunosorbent assay: performance characteristics and reference intervals. *J Feline Med Surg.* 25(5). p. 1-8.

Troia R, Gruarin M, Foglia A, Agnoli C, Dondi F, Giunti M. 2017. Serum amyloid A in the diagnosis of feline sepsis. *J Vet Diagnostic Investig.* 29(6). p. 856–859.

Tuna GE, Ulutas B. 2022. Investigation of acute-phase protein concentrations in healthy and various diseased cats. *Pol J Vet Sci.* 25(4). p. 589–597.

Verrico CD, Wesson S, Konduri V, Hofferek CJ, Vazquez-perez J, Blair E, Jr KD, Salimpour P, Decker WK, Halpert MM. 2020. Study of Daily Cannabidiol for the Treatment of Canine Osteoarthritis Pain. *Pain.* 161(9). p. 2191–2202.

Winer JN, Arzi B, Verstraete FJM. 2016. Therapeutic management of feline chronic gingivostomatitis: A systematic review of the literature. *Front Vet Sci.* 3(54). p. 1-10.

Winkel VM, Pavan TLR, Wirthl VABF, Alves ALN, Lucas SRR. 2015. Serum  $\alpha$ -1 acid glycoprotein and serum amyloid a concentrations in cats receiving antineoplastic treatment for lymphoma. *Am J Vet Res.* 76(11). p. 983–988.

Yu CHJ, Rupasinghe HPV. 2021. Cannabidiol-based natural health products for companion animals: Recent advances in the management of anxiety, pain, and inflammation. *Res Vet Sci.* 140. p. 38–46.

Yuki M, Aoyama R, Nakagawa M, Hirano T, Naitoh E, Kainuma D. 2020. A clinical investigation on serum amyloid a concentration in client-owned healthy and diseased cats in a primary care animal hospital. *Vet Sci.* 7(2). p. 1–9.



## ANEXOS

**Anexo 1** – Certificado de participação na organização dos cursos *Soft Tissue Surgery II e IV*, promovidos pela *European School of Advanced Veterinary Studies*.



Para os devidos efeitos se declara que Daniela Silva participou na organização dos cursos *Soft Tissue Surgery II e IV*, promovidos pela *European School for Advanced Veterinary Studies* que se realizaram nos dias 19 a 23 de Junho e 11 a 15 de Setembro de 2023, respectivamente, na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

A Daniela Silva desenvolveu um trabalho de apoio em todas as vertentes logísticas do referido curso, assistiu a todas as suas atividades práticas e esteve envolvida em todas as atividades formativas levadas a cabo pelos formadores Gilles Dupé, Laurent Finji e Get ter Haar diplomados pelo *European College of Veterinary Surgeons*.

O seu empenho e dedicação foram exemplares.

A coordenadora

A handwritten signature in black ink that reads 'Lisa Mestrinho'.

Lisa Mestrinho DVM, MsC, PhD, FAVD, DAVDC  
Professor Auxiliar com agregação  
FMV ULisboa

**Anexo 2 – Parecer de aprovação da Comissão de Ética para a Investigação e Ensino (CEIE) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.**



**FACULDADE DE  
MEDICINA VETERINÁRIA**  
*Comissão de Ética para a  
Investigação e Ensino (CEIE)*



Exma. Senhora  
Professora Doutora Lisa Mestrinho  
Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa, 6 de janeiro de 2023

Assunto: Avaliação projeto de investigação – N/Refº 002/2023

Vimos pela presente informar V.Exa. que a CEIE, após ter avaliado as atividades que envolvem manipulação de animais, no âmbito do projeto de investigação "Ensaio clínico randomizado e duplamente cego sobre o benefício analgésico do canabidiol (CBD) em gatos com gengivoestomatite crónica refratários a outros tratamentos" considerou que estão salvaguardados os princípios éticos e de bem-estar animal exigidos pela legislação vigente e pelo código de boas práticas, pelo que aprovou a execução do protocolo experimental nas instalações e serviços da FMV, conforme requerido por V.Exa.

Com os melhores cumprimentos,

Graça Ferreira Dias  
Coordenadora da Comissão de Ética para a Investigação e Ensino

**Anexo 3 – Termo de consentimento informado preenchido pelos detentores para autorizar a inclusão dos seus animais no estudo.**



**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
COMISSÃO DE ÉTICA E BEM-ESTAR ANIMAL (CEBEA)**

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO**

Eu, \_\_\_\_\_,  
portador(a) do cartão de cidadão n.º \_\_\_\_\_, proprietário(a) do animal de nome  
\_\_\_\_\_, raça \_\_\_\_\_, idade \_\_\_\_\_ e género \_\_\_\_\_, declaro  
que autorizo a inclusão no estudo intitulado **Avaliação de três proteínas de fase aguda em gatos com gengivostomatite crónica medicados com canabidiol**.

Declaro em particular que:

Tomei conhecimento da elegibilidade do meu animal para a inclusão no estudo porque possui diagnóstico de gengivostomatite crónica, uma doença debilitante e dolorosa, podendo assim beneficiar dos efeitos analgésicos do fármaco em estudo.

Que o meu animal será tratado por um grupo de veterinários clínicos práticos que desenvolvem investigação clínica e que contribuem para a melhoria da saúde animal, cuidados de saúde, educação, investigação e inovação científica, aplicando todas as práticas atualmente recomendadas (Investigadora responsável Professora Doutora Lisa Mestrinho).

O CBD é uma substância com propriedades analgésicas, alternativa aos opiáceos, que de forma emergente tem sido usada para o tratamento da dor crónica e poderá dessa forma aumentar a qualidade de vida do meu animal, no entanto a amplitude dos benefícios analgésicos na gengivostomatite crónica felina ainda é pouco conhecida.

Fui devidamente informado de que:

O objetivo do ensaio clínico consiste na avaliação dos benefícios da aplicação do CBD enquanto analgésico para controlo da dor dentária. O tratamento consiste em administrar o fármaco via oral, na dose de 2mg/kg, de 12 em 12h durante 30 dias.

Que o meu animal pertencerá ou a um grupo medicado com CBD ou a um grupo medicado com placebo, e que essa informação apenas me poderá ser fornecida aquando término do estudo.

Autorizo a realização de 2 colheitas sanguíneas na totalidade para realização de análises bioquímicas, no dia 0 e no dia 30 após início do tratamento.

Comprometo-me a efetuar a administração da fórmula fornecida em estudo, segundo as indicações que me foram explicitamente descritas e a comparecer nas consultas de reavaliação aos dias 7, 15, 21, e 30 após início do tratamento.

Detalhes do estudo foram esclarecidos por (nome) \_\_\_\_\_ em (data) \_\_\_\_\_

Lisboa, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2023

**Anexo 4** – Questionário de classificação SDAI preenchido pelos detentores semanalmente durante o decorrer do estudo (Reiter et al. 2019).

**Avaliação de três proteínas de fase aguda em gatos com gengivostomatite crónica medicados com canabidiol**

Questionário aos Tutores

Paciente:

Tutor:

Apetite	3	Só come comida em puré ou alimentado à mão.
	2	Come comida húmida, mas não consegue comer comida seca.
	1	Come comida seca e húmida, mas em menor quantidade.
	0	Come normalmente.
Nível de Atividade	3	Sem interesse nas pessoas ou outros animais, passa a maioria do tempo a dormir.
	2	Baixo nível de atividade - brinca ocasionalmente quando estimulado por pessoas ou outros animais.
	1	Brinca espontaneamente, mas não frequentemente.
	0	Atividade normal - brincalhão e ativo.
Grooming (Limpeza e Higiene)	3	Não faz <i>grooming</i> .
	2	Faz <i>grooming</i> ocasionalmente, mas não como antes.
	1	Faz <i>grooming</i> de um modo excessivo.
	0	Faz <i>grooming</i> normal.
Conforto	0-3	Numa escala de 0 a 3, sendo 0 bastante confortável e 3 bastante doloroso, classifique o grau de conforto.

**Dia 0**      **Data:**

Apetite \_\_\_\_\_ Nível de atividade \_\_\_\_\_ *Grooming* \_\_\_\_\_ Conforto \_\_\_\_\_

**Dia 7**      **Data:**

Apetite \_\_\_\_\_ Nível de atividade \_\_\_\_\_ *Grooming* \_\_\_\_\_ Conforto \_\_\_\_\_

**Dia 15**      **Data:**

Apetite \_\_\_\_\_ Nível de atividade \_\_\_\_\_ *Grooming* \_\_\_\_\_ Conforto \_\_\_\_\_

**Dia 21**      **Data:**

Apetite \_\_\_\_\_ Nível de atividade \_\_\_\_\_ *Grooming* \_\_\_\_\_ Conforto \_\_\_\_\_

**Dia 30**      **Data:**

Apetite \_\_\_\_\_ Nível de atividade \_\_\_\_\_ *Grooming* \_\_\_\_\_ Conforto \_\_\_\_\_

**Anexo 5** – Questionário de classificação SDAI preenchido pelo clínico semanalmente durante o decorrer do estudo (Reiter et al. 2019).

**Avaliação de três proteínas de fase aguda em gatos com gengivostomatite crônica medicados com canabidiol**

Paciente:

Tutor:

**Stomatitis disease activity index (SDAI)**

SDAI	Dia 0	Dia 7	Dia 15	Dia 21	Dia 30
Avaliação do tutor					
Peso					
Inflamação da mucosa bucal maxilar					
Inflamação da mucosa bucal mandibular					
Inflamação da gengiva maxilar					
Inflamação da gengiva mandibular					
Inflamação lateral dos pilares glossopalatinos					
Inflamação da glândula salivar molar					
Inflamação na orofaringe					
Inflamação lingual e/ou sublingual					
<b>Total (máximo = 30)</b>					

<b>Avaliação do Tutor</b>	0	Melhoria Significativa
	1	Ligeira Melhoria
	2	Sem alteração
	3	Pior
<b>Peso (comparado com a visita mais recente)</b>	0	Ganho >0,5kg
	1	Ganho 0,25-0,5kg
	2	Ganho <0,25kg
	3	Perda de Peso
<b>Inflamação</b>	0	Nenhuma
	1	Ligeira
	2	Moderada
	3	Severa