

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO VINCRISTINA-IVERMECTINA NO  
TRATAMENTO DO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO**

**LAIANE FERREIRA BULHOSA**

**SALVADOR – BA**

**SETEMBRO 2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO VINCRISTINA-IVERMECTINA NO  
TRATAMENTO DO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO**

**LAIANE FERREIRA BULHOSA**

Médica Veterinária

**SALVADOR – BA**

**SETEMBRO 2018**

**LAIANE FERREIRA BULHOSA**

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO VINCRISTINA-IVERMECTINA NO  
TRATAMENTO DO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao  
Programa de Pós-graduação em Ciência  
Animal nos Trópicos, da Universidade  
Federal da Bahia, como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Ciência  
Animal nos Trópicos.

Área de concentração: Saúde Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Stella Maria Barrouin Melo

Coorientadora: Profa. Dra. Alessandra Estrela Lima

**SALVADOR – BA**

**SETEMBRO 2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bulhosa, Laiane Ferreira

Avaliação da associação vincristina-ivermectina no  
tratamento do tumor venéreo transmissível canino /

Laiane Ferreira Bulhosa. -- Salvador, 2018.

87 f. : il

Orientadora: Stella Maria Barrouin-Melo.

Coorientadora: Alessandra Estrela da Silva Lima.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em  
Ciência animal nos Trópicos) -- Universidade Federal  
da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia,  
2018.

1. Tumor venéreo transmissível. 2. Glicoproteína-P.  
3. Quimioterapia. I. Barrouin-Melo, Stella Maria. II.  
Lima, Alessandra Estrela da Silva. III. Título.

Avaliação da associação vincristina-ivermectina no tratamento do tumor  
venéreo transmissível caníno

Laiane Ferreira Bulhosa

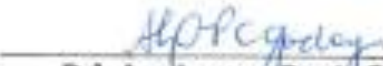
Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de  
Mestre em Ciência Animal nos Trópicos

Salvador, 28 de setembro de 2018

Comissão examinadora:



Dr. Tiago da Cunha Peixoto  
EMEVZ / UFBA



Drª. Ana Leonor Pardo Campos Godoy  
EMEVZ / UFBA



Drª Karine Araújo Damasceno  
EMEVZ / UFBA



Drª Stella Maria Barrouin Melo  
Orientadora  
EMEVZ / UFBA

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

LAIANE FERREIRA BULHOSA – Nascida em 16 de setembro de 1991, na cidade de Salvador- Ba. Formada em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em abril de 2016. Ingressou no programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da Bahia em outubro de 2016, sob orientação da professora Dra. Stella Maria Barrouin Melo e defendeu sua dissertação intitulada “Avaliação da associação vincristina-ivermectina no tratamento do tumor venéreo transmissível canino” no dia 28 de setembro de 2018.

“Que ninguém se engane, só se consegue a simplicidade através de muito trabalho.”

Clarisse Lispector

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora, Professora Stella Maria Barrouin Melo, por todo conhecimento transmitido e por ter me proporcionado a oportunidade de viver uma experiência onde adquirir muito aprendizado tanto para minha vida profissional, como pessoal. Agradeço pela paciência e confiança.

A toda equipe do Hospital-Escola de Medicina Veterinária da UFBA (HOSPMEV), em especial aos residentes e técnicos do setor de clínica médica e patologia veterinária, que sempre estiveram dispostos a ajudar. Sem dúvidas a conclusão desse trabalho dependia dessa colaboração. A Laís Pereira e Gabriel Gonçalves por todo auxílio na execução desse projeto.

A Professora Alessandra Estrela Lima e a Professora Daniela Farias Larangeira por todo ensinamento e pelo apoio na elaboração desse estudo. A Emanuel F. Martins Filho por toda ajuda para que a conclusão desse trabalho fosse possível.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela outorga da bolsa de estudos.



## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1 – Aspecto botânico de <i>Catharanthus roseus</i> , conhecida popularmente como “vinca rósea”, notar a variedade das cores das flores da planta (rosa, roxo e branco).....	37
Figura 2 – Glicoproteína-P em um modelo proposto por Higgins para explicar sua atuação.....	40
Figura 3 – Desenho experimental.....	49
Figura 4 – Citologia aspirativa com agulha fina de tumor venéreo transmissível em cadela. Apresentação genital do tumor.....	51
Figura 5 – Material coletado do tumor e transferido para lâmina de vidro, com extremidade fosca.....	51
Figura 6 – Apresentação de TVT genital em cão macho, com múltiplos nódulos. Observa-se uma massa tumoral avermelhada na base do pênis de superfície irregular e aspecto de couve-flor (seta branca) e várias outras massas no corpo do pênis (setas pretas) (G-Iv/Vin).....	54
Figura 7 – Tumor venéreo transmissível em cadela. Apresentação genital, massa de superfície irregular exteriorizada pela vulva, consistência macia (seta preta), avermelhada e com secreção serossanguinolenta (seta branca) (G-Vin).....	54
Figura 8 – Fotomicrografia de diferentes tipos citomorfológicos do Tumor Venéreo Transmissível canino.....	59
Figura 9 – Fotomicrografias de diferentes tipos morfológicos do Tumor Venéreo Transmissível canino.....	62
Figura 10 – Apresentação de TVT genital em cadela do G-Iv/Vin antes de iniciar o tratamento (A <sub>T</sub> ) e após o término do tratamento (D <sub>T</sub> ).....	65

Figura 11 – Apresentação de TVT extragenital (cutâneo) em cão macho do G-Vin antes de iniciar (A <sub>T</sub> ) o tratamento e após o término do tratamento (D <sub>T</sub> ).....	65
--	----

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1 – Parâmetros clínicos utilizados para calcular a pontuação do escore clínico em cães diagnosticados com TVTC no HOSPMEV-UFBA, no período de janeiro de 2017 a agosto de 2018.....	46
Tabela 2 - Características gerais e aspectos tumorais dos cães do estudo no grupo controle (G-Vin) e no grupo experimental (G-Iv/Vin) atendidos no HOSPMEV-UFBA no período de janeiro de 2017 a agosto de 2018.....	56
Tabela 3 – Parâmetros hematológicos e bioquímicos sanguíneos dos 41 cães atendidos no HOSPMEV-UFBA no período de janeiro de 2017 a agosto de 2018.....	57
Tabela 4 – Critérios de malignidade encontrados nos diferentes tipos citomorfológicos de tumor venéreo transmissível canino nos cães atendidos no HOSPMEV-UFBA no período de janeiro de 2017 a agosto de 2018.....	60
Tabela 5 - Número de aplicações de vincristina até a regressão completa do tumor nos cães do G-Vin e do G-Iv/Vin atendidos no HOSPMEV-UFBA, no período de janeiro de 2017 a agosto de 2018.....	63
Tabela 6 – Detalhes do protocolo de tratamento em cães do grupo tratado somente com vincristina (G-Vin) do grupo tratado com vincristina associado à ivermectina (G-Iv/Vin) atendidos no HOSPMEV-UFBA, no período de janeiro de 2017 a agosto de 2018.....	64
Tabela 7 – Diferença entre tempo de tratamento e número de aplicações de vincristina em cães do grupo tratado somente com vincristina (G-Vin) do grupo tratado com vincristina associado à ivermectina (G-Iv/Vin) com tumores do tipo plasmocitoide, atendidos no HOSPMEV-UFBA, no período de janeiro de 2017 a agosto de 2018.....	66

**LISTA DE SIGLAS**

TVT – Tumor venéreo transmissível

NK – Células exterminadoras naturais

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

BCL-2 – Célula B de linfoma 2

MDR-1 – Gene de resistência à múltiplas drogas

MRP1 – Resistência à múltiplas drogas- associada à proteína 1

GSTpi – Glutathiona-S-transferase pi

PG-P – Glicoproteína-P

TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

FA – Fosfatase alcalina

AST – Asparatoaminotransferase

ALT – Alaninaminotransferase

CYP – Citocromo P450

CD3 – Grupamento de diferenciação 3

CD4 – Grupamento de diferenciação 4

CD8 – Grupamento de diferenciação 8

CD79 – Grupamento de diferenciação 79

TGF- $\beta$  – Fator transformador de crescimento beta

MAO – Monoamina oxidase

SC – Subcutâneo

HOSPMEV – Hospital-Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia

H.E. – Hematoxilina-eosina

CHGM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

VGM – Volume globular médio

AKT – Quinase atividade kit

mTOR – Alvo mamífero da rapamicina

WNT-TCF – Via de sinalização com complexo Tcf

P2X7/P2X7 – Purinoreceptor P2X

PAK1 – Serina/treonina-proteína quinase

NANOG – Fator de transcrição em células tronco embrionárias

SOX2 – Sexo determinante região Y - box

OCT4 – Fator de transcrição de ligação ao octâmero 4

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	17
1.INTRODUÇÃO .....	19
2.HIPÓTESE.....	22
3.OBJETIVO.....	23
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4.REVISÃO DE LITERATURA .....	24
4.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO TVT CANINO.....	24
4.2 FISIOPATOLOGIA DO TVT EM CÃES.....	25
4.3. APRESENTAÇÃO CLÍNICA DO TVT EM CÃES.....	28
4.4 DIAGNÓSTICO.....	30
<b>4.4.1 Diagnóstico clínico, diferencial e prognóstico.....</b>	<b>30</b>
<b>4.4.2 Citopatologia e histopatologia.....</b>	<b>32</b>
<i>4.4.2.1 Técnicas de amostragem do tumor para diagnóstico laboratorial</i>	
<i>4.4.2.1 Técnicas de amostragem do tumor para diagnóstico laboratorial.....</i>	<i>32</i>
<i>4.4.2.2 Aspectos citológicos e histológicos do TVT.....</i>	<i>33</i>
4.5 TRATAMENTO DO TVT POR QUIMIOTERAPIA.....	35
<b>4.5.1 A vincristina na quimioterapia do TVT.....</b>	<b>36</b>
<b>4.5.2 Mecanismo de ação e farmacocinética da vincristina.....</b>	<b>37</b>
<b>4.5.3 Resistência do TVT canino à vincristina e a glicoproteína-P.....</b>	<b>38</b>
<b>4.5.4 A ivermectina como fármaco de interação com a glicoproteína-P....</b>	<b>40</b>
5.MATERIAL E MÉTODOS .....	44
5.1. ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS.....	44
5.2. EXAME CLÍNICO.....	44

5.3. ESTADIAMENTO CLÍNICO.....	45
5.4 EXAMES LABORATORIAIS.....	47
5.5.FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO.....	47
<b>5.5.1 Grupo Vincristina (G-Vin).....</b>	<b>47</b>
<b>5.5.2 Grupo Vincristina/Ivermectina (G-Vin/Iv).....</b>	<b>48</b>
5.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	49
5.7 ANÁLISE CITOLOGICA E HISTOPATOLÓGICA.....	50
<b>5.7.1 Citologia.....</b>	<b>50</b>
<b>5.7.2 Histopatologia.....</b>	<b>52</b>
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
6.RESULTADOS.....	53
6.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	53
6.2 CARACTERIZAÇÃO CITOLOGICA E HISTOPATOLÓGICA DOS TUMORES.....	58
6.3 TOXICIDADE TERAPÊUTICA E RESPOSTA AOS PROTOCOLOS.....	62
7. DISCUSSÃO.....	67
8. CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73
ANEXO 1- Termo de consentimento livre e esclarecido.....	86
ANEXO 2- Certificado de autorização da Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Escola de Medicina e Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia.....	87
ANEXO 3 – Características individuais dos cães do G-Vin e G-Vin/Iv atendidos no HOSPMEV-UFBA no período de janeiro de 2017 a agosto de 2018.....	88

Avaliação da associação vincristina-ivermectina no tratamento do tumor venéreo transmissível canino

**RESUMO**

O tumor venéreo transmissível (TVT) é uma doença neoplásica, sexualmente transmissível, que acomete cães e tem características patológicas ainda não completamente elucidadas. O tratamento clínico de rotina baseia-se no uso do sulfato de vincristina, porém o fármaco promove efeitos adversos e uma parte dos casos não responde devido à resistência tumoral à droga. A literatura reporta melhor desempenho terapêutico da vincristina quando associada à ivermectina, fármaco que se liga à glicoproteína-P impedindo o efluxo celular de xenobióticos, porém são poucos os estudos prospectivos. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar prospectivamente se a associação com a ivermectina seria capaz de permitir a redução das doses e frequência de administrações da vincristina em cães portadores de TVT. Foram atendidos no HOSPMEV-UFBA 41 cães machos e fêmeas com TVT, cujo diagnóstico se baseou no exame clínico, citológico e histopatológico. Os cães foram aleatoriamente distribuídos em grupos, o G-Vin (n = 10) tratado apenas com vincristina a cada sete dias na dose de 0,5 mg/m<sup>2</sup> IV, e o G-Iv/Vin (n = 10) tratado com vincristina na mesma dosagem e intervalo, juntamente com ivermectina SC, em torno de 24-48 horas antes da administração de vincristina, a cada quinze dias. Todos os cães foram avaliados por exames hematológicos, bioquímica sérica e citologia das lesões antes do início do tratamento e a cada visita em que receberam a dose de vincristina. O fim do tratamento foi determinado pelo desaparecimento do tumor ao exame físico e ausência de células tumorais ao exame citológico da região acometida. No G-Vin três cães (3/10) apresentavam tumor do tipo linfocitoide, dois (2/10) apresentavam tumor do tipo misto e cinco (5/10) apresentavam tumor do tipo plasmocitoides; no G-Iv/Vin um (1/10) apresentou tumor tipo linfocitoide, três (3/10) do tipo misto e seis (6/10) do tipo plasmocitoide. Não houve diferença nos valores de escore entre os cães de ambos os grupos antes de iniciar o tratamento, entretanto, houve diferença dentro dos grupos antes e após o tratamento, G-Vin ( $p= 0,0059$ ) e G-Iv/Vin ( $p= 0,0039$ ). Não houve diferença no tempo de tratamento entre os dois grupos ( $p = 0,48$ ) e as doses necessárias de vincristina para remissão total do tumor ( $p = 0,80$ ). No entanto, em cães do G-Vin houve uma queda significativa nos valores de leucócitos totais ( $p= 0,0027$ ), neutrófilos ( $p= 0,0371$ ) e monócitos ( $p= 0,0468$ ) quando comparados antes e após o tratamento, o que não ocorreu com os cães do G-Iv/Vin. Não houve diferença significativa no tratamento de cães com tumores do



tipo plasmocitoide em ambos os grupos. Conclui-se que o tipo plasmocitoide foi o mais frequente neste estudo e apesar de não haver diferença estatística entre os cães dos dois grupos, há benefício terapêutico em associar a ivermectina e a vincristina para o tratamento de TVT.

**Palavras-Chave:** Citologia aspirativa, Quimioterapia, Neoplasia, Caninos, Desfecho, Glicoproteína-P.

Evaluation of the vincristine-ivermectin combination in the treatment of canine transmissible venereal tumor

**ABSTRACT**

Transmissible venereal tumor (TVT) is a neoplastic, sexually transmitted disease that affects dogs and has pathological features that are not fully understood yet. Routine clinical treatment is based on the use of vincristine sulfate, but the drug promotes adverse effects and a portion of cases does not respond due to tumor resistance to the drug. The literature reports better therapeutic performance of vincristine when combined with ivermectin, a drug that binds to the P-glycoprotein, preventing the cellular efflux of xenobiotics, but few prospective studies. Thus, this study aimed to investigate prospectively whether the combination with ivermectin would be able to reduce the doses and frequency of vincristine administrations in dogs with TVT. Thirty-one male and female dogs with TST were treated at HOSPMEV-UFBA, whose diagnosis was based on clinical, cytological and histopathological examination. The dogs were randomized into groups, G-Vin (n = 10) treated with vincristine alone every 7 days at the dose of 0.5 mg / m<sup>2</sup> IV, and G-Vin/Iv (n = 10) treated with vincristine at the same dosage and interval, along with ivermectin SC, around 24-48 hours prior to administration of vincristine every 15 days. All dogs were evaluated for hematological exams, serum biochemistry, and cytology of the lesions prior to initiation of treatment and at each visit receiving the vincristine dose. The end of the treatment was determined by the disappearance of the tumor at the physical examination and absence of tumor cells at the cytological examination of the affected region. In G-Vin three dogs (3/10) presented lymphocytic type tumor, two (2/10) had mixed type tumor and five (5/10) had a plasmacytic type tumor; in G-Vin/Iv one (1/10) presented a lymphocyte type tumor, three (3/10) of the mixed type and six (6/10) of the plasmacytoid type. There was no difference in the score values between the dogs of both groups before starting the treatment, however, there was difference in the groups before and after treatment, G-Vin (p = 0.0059) and G-Vin/Iv p = 0.0039). There was no difference in treatment time between the two groups (p = 0.48) and the required doses of vincristine for total tumor remission (p = 0.80). However, in G-Vin dogs there was a significant drop in total leukocytes (p = 0.0027), neutrophils (p = 0.0371) and monocytes (p = 0.0468) when compared before and after treatment, which did not occur with G-Iv/Vin dogs. There was no significant difference in the treatment of dogs with plasmacytic type tumors in both groups. It is concluded that the plasmacytic type was the most frequent in this study and

although there is no statistical difference between the dogs of the two groups, there is a therapeutic benefit in associating ivermectin and vincristine for the treatment of TVT.

**Key words:** Fine-needle aspiration cytology; chemotherapy; neoplasm; canines; outcome; p-glycoprotein.

## 1. INTRODUÇÃO

O tumor venéreo transmissível (TVT) canino foi citado pela primeira vez no ano de 1820, por Hüzzard, na Europa, sendo que em 1828 foi descrito por Delabere-Blaine, na Inglaterra (RIBEIRO & ZAPPA, 2008). Em 1904, Anton Sticker, em Frankfurt, na Alemanha, atribuiu uma origem neoplásica à lesão e a caracterizou como linfossarcoma (STICKER, 1904). O autor detalhou aspectos patológicos do tumor, como a transmissão associada a células transplantáveis, e o acometimento preferencial da vagina e pênis dos cães (STICKER, 1904; BOSCO; VERVERIDES, 2004). Desde então, a enfermidade ficou conhecida como tumor de Sticker (FREITAS, 2009), e foi reportada em diversos países, como Estados Unidos (BLOOM, PAFF; NOBACK, 1951), Bahamas (HIGGINS, 1966), Canadá (PRIESTER, 1976), Nigéria (AMBER; HENDERSON, 1982), Senegal (PARENT et al., 1983), Austrália (ROTHWELL et al., 1987), Brasil (PACHALY et al., 1999) e México (ROMERO et al., 2010).

Sua distribuição é mundial, porém acomete mais cães de áreas tropicais e subtropicais, sendo que no Brasil é uma neoplasia muito mais comum do que em países do Hemisfério Norte (PACHALY et al., 1999). O TVT acomete, na maior parte das vezes, cães que vivem em áreas com altos índices de cães abandonados (SOUSA et al., 2000). A doença está relacionada a fatores socioeconômicos, culturais, aquisição não responsável e falta de manejo populacional dos cães, consequências da deficiência de políticas públicas e estratégias eficientes para lidar com questões sanitárias, comuns em países caracterizados por desigualdades (GARCIA et al., 2012).

O TVT é um tumor que pode ser transplantado entre indivíduos de uma mesma espécie, inclusive membros da família Canidae, como coiotes, raposas e lobos (HIGGINS, 1966). Existem neoplasias que acometem outros animais com o comportamento de transmissão semelhante ao TVT de cães, como o tumor facial do demônio da Tasmânia (*Sarcophilus harrisi*, Austrália), a leucemia de ameijoas moles (*Mya arenaria*, costa leste da América do Norte), e linhagens de sarcoma que acometem o hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) (YIN et al., 2015; OSTRANDER et al., 2015). Acredita-se que em até 35 anos o tumor facial do demônio da Tasmânia possa dizimar a espécie (OSTRANDER et al., 2015) e por isso estudos para desenvolvimento de vacinas contra o tumor vêm sendo realizados (PYE et al., 2016). Em contraste à origem única do TVT canino e do tumor dos demônios da Tasmânia, os tumores que acometem o hamster sírio dourado têm múltiplas

origens, sendo na maior parte das vezes fatais, agressivos e altamente transmissíveis (OSTRANDER et al., 2015).

As características patológicas do TVT canino ainda não foram completamente elucidadas (ECHER et al., 2015). As diversas teorias para sua histogênese ocasionaram até mesmo nomenclaturas diferentes, mais aceita a teoria histiocitária por algum tempo (CRUZ et al., 2009). Entretanto, estudos mais recentes demonstraram que o TVT pode ter outras origens diferentes da histiocítica (MASCARENHAS et al., 2014). Além disso, os cariótipos de células de TVT de diferentes regiões geográficas do mundo são semelhantes, o que reforça a ideia da capacidade dessas células se transplantarem tão facilmente por meio de células viáveis (MUKARATIRWA; GRUYS, 2003). Estudos demonstraram ainda que a transmissão celular do TVT independe de infecção viral (MURGIA et al., 2006; VONHOLDT; OSTRANDER, 2006). Dessa forma, o agente etiológico originário do TVT canino ainda não é conhecido (MUKARATIRWA; GRUYS, 2003).

O exame citológico da lesão tumoral é utilizado no diagnóstico (BRANDÃO et al., 2002) e permite a observação dos diferentes tipos citomorfológicos de TVT, sendo eles o linfocitoide, o plasmocitoide e o linfoplasmocitoide, este também denominado misto (AMARAL, et al., 2004). Os tumores de morfologia plasmocitoide são menos sensíveis e em alguns casos respondem apenas parcialmente ao tratamento quimioterápico (FLORÉZ et al., 2014), por isso têm sido associados a um maior grau de agressividade e também de resistência (AMARAL et al., 2004).

Um dos principais processos responsáveis pela resistência dos tumores ao tratamento quimioterápico é a superexpressão de glicoproteína-P na membrana das células tumorais. Esta proteína tem como função transportar fármacos para fora das células até que cheguem a níveis citoplasmáticos tão baixos que não sejam capazes de causar morte celular (FLORÉZ et al., 2014). Tumores de padrão plasmocitoide apresentam maior expressão de glicoproteína-P quando comparados aos outros dois tipos citomorfológicos (GASPAR, 2005).

O tratamento é realizado utilizando a vincristina, que deve ser aplicada exclusivamente pela via endovenosa (VIANA, 2014), em intervalos semanais até a remissão completa do tumor (RODRIGUES et al., 2001; DUARTE et al., 2006). Apesar de ser o fármaco mais utilizado para o tratamento dessa neoplasia, casos de resistência têm sido descritos ao longo do tempo (BRANDÃO et al., 2002; BUENO et al., 2003; SUDJAIDEE et al., 2012; FERNANDES et al., 2013; SILVA et al., 2014; FERREIRA, 2016). Além disso, o seu uso ocasiona efeitos adversos como a diminuição significativa na fração leucocitária no hemograma (CAMACHO; LAUS, 1987; FARO et al., 2008; HANTRAKUL et al., 2014),

alterações gastrointestinais (RAMADINHA et al., 2016), queda de pelo, lesão tecidual, flebite e necrose no ponto de injeção (CANAL et al., 2005). Alguns textos citam resultados positivos em cães tratados com a associação da ivermectina com a vincristina (LAPA, 2009), entretanto, o mecanismo de ação dessa associação não foi bem estabelecido. A ivermectina é um fármaco da família das lactonas macrocíclicas (LESPINE et al., 2006) e age inibindo a glicoproteína-P (POULIOT et al., 1997). Este fármaco interage com a glicoproteína-P diminuindo a resistência das células ao quimioterápico (LESPINE et al., 2006). Recentemente foram descritos diversos mecanismos de ação antineoplásica atribuídos à ivermectina (Juarez et al., 2018).

Com este estudo objetivou-se avaliar a eficiência em associar a vincristina e a ivermectina no tratamento de cães naturalmente infectados por TVT, visando diminuir o tempo de tratamento e o número de aplicações do quimioterápico, reduzindo consequentemente os efeitos colaterais causados pela terapia antineoplásica.

## **2. HIPÓTESE**

A ação antitumoral da vincristina no tratamento do TVT em cães pode ser potencializada por meio do uso concomitante com a ivermectina, permitindo o uso de doses menores ou menos aplicações de vincristina para obter eficácia clínica satisfatória, determinada pela regressão total do tumor.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se existe benefício terapêutico na associação de vincristina com ivermectina em cães naturalmente acometidos pelo TVT.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estabelecer o diagnóstico específico com base na citomorfologia tumoral;
- b) Verificar a concordância da classificação dos subtipos de TVT pela citologia com a histopatologia;
- c) Comparar estatisticamente o tempo de resposta clínica de controle tumoral em cães com TVT tratados com vincristina associada ou não à ivermectina;
- d) Comparar estatisticamente os efeitos adversos em parâmetros clínicos e hematológicos do uso da vincristina associada ou não a ivermectina nos cães tratados;
- e) Comparar estatisticamente o tempo de tratamento dos cães segundo o tipo citomorfológico do TVT tratados com vincristina associada ou não à ivermectina.



## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO TVT CANINO

O TVT é mais frequentemente diagnosticado no sistema genital de cães, representando 50% dos casos das neoplasias nessa região anatômica (ANDRADE et al., 2012). Esta é uma neoplasia muito comum na rotina veterinária no Brasil, sendo um dos tumores que acometem cães no país (BELLEI et al., 2006). Estudos realizados no estado da Santa Catarina avaliando 1065 casos de neoplasias cutâneas indicaram que 7,5% correspondiam a TVT, com segundo maior número de casos, sendo o mastocitoma a neoplasia de pele mais frequente com 13,4% dos casos (BELLEI et al., 2006). Sabidamente o TVT cutâneo é uma das apresentações extragenitais mais comuns dessa neoplasia (BRANDÃO et al., 2002). Entretanto, relata-se que acima de 60% dos casos se manifestam na porção genital externa de cães machos e fêmeas (ECHER et al., 2015). Em um estudo realizado no Paraná, destaca-se uma prevalência de TVT em 3,3% dos casos de neoplasias diagnosticadas em cães, sendo o terceiro tumor mais frequente nesses animais, precedido pelos tumores mamários e o mastocitoma grau II (NARDI et al., 2002). Estudos desenvolvidos em Jaboticabal, São Paulo, apontaram que o TVT era responsável por 43% dos tumores caninos diagnosticados nesta região (SOBRAL et al., 1998) e que a frequência foi maior em áreas onde havia muitos cães errantes (SOUSA et al., 2000).

O TVT foi considerado a neoplasia que mais acomete cães em áreas tropicais e subtropicais, onde a prevalência aumenta durante a primavera e o verão, estações mais quentes e luminosas do ano, quando ocorre a maioria dosaios (SOUSA et al., 2000; PUROHIT, 2008; PRIEBE et al., 2011).

Estudos demonstram que há uma ocorrência maior em fêmeas, o que pode estar ligado ao fato dessas copularem com diversos machos durante o período do cio, aumentando os riscos de contrair a doença (BRITO et al., 2006). Em um estudo retrospectivo realizado em Jaboticabal, São Paulo, entre os anos de 2000 e 2004, 51,1% dos cães acometidos pela neoplasia eram fêmeas (SILVA et al., 2007a). Outro estudo, feito no estado do Rio de Janeiro, em 2016, revelou que dos 203 cães acometidos por TVT, 117 possuíam o tumor somente na região genital, e destes 68,38% também eram fêmeas (PEIXOTO et al., 2016). Por estarem em maior atividade sexual, os cães com idade entre três e cinco anos apresentam maior risco de adquirirem a doença (SILVA et al., 2007a). Quanto à raça, a incidência do TVT é maior

em cães sem raça definida (SRD), como demonstrou um estudo apontando que cerca de 70% dos cães acometidos no Brasil eram SRD (BRANDÃO et al., 2002).

A incidência do TVT também está ligada ao perfil dos guardiões dos animais que adquirem essa neoplasia, sendo que, aqueles que permitem que seus cães tenham livre acesso à rua, favorecem o contato dos seus animais com cães errantes (NARDI et al., 2002). O desconhecimento sobre guarda responsável caracteriza a maior parte da população brasileira, assim como o baixo poder aquisitivo (SOTO et al., 2006) e uma das consequências disto é o abandono de animais, também ligado a fatores socioeconômicos, culturais e a falta de planejamento governamental para manejo populacional de animais de estimação, fatores que influenciam diretamente na saúde animal, conseqüentemente na saúde pública (GARCIA et al., 2012). Assim, a alta incidência do tumor pode ser atribuída ao fato de existirem muitos cães de rua nas cidades brasileiras, facilitando a transmissão e propagação da doença (BELLEI et al., 2006).

Cães não supervisionados, semi-domiciliados e que buscam abrigo em propriedades abandonadas são os principais carreadores de TVT, e qualquer tipo de proximidade ou contato entre cães susceptíveis e infectados favorece a aquisição dessa neoplasia (BOSCOS; VERVERIDES, 2004). Os grupos de alto risco incluem, além dos cães que costumam escapar da área do domicílio, os cães de guarda e cães de caça, que acabam por manter contato durante os momentos de encontro dos guardiões (BOSCOS; VERVERIDES, 2004). Diferentemente, os cães com alto valor zootécnico, comercial ou estimativo tendem a ter proprietários que buscam regularmente cuidados veterinários, proporcionando aos seus animais um ambiente inacessível às ruas, além de promoverem mais castrações, medidas essas que diminuem os riscos de transmissão do TVT (HUPPES et al., 2014). O TVT mostrou ser raro em cães de companhia supervisionados ou domiciliados (BOSCOS; VERVERIDES, 2004).

#### 4.2 FISIOPATOLOGIA DO TVT EM CÃES

Na maior parte das vezes, o único modo de classificar um tumor e de estabelecer sua histogênese é através do estudo celular, porém a definição da estrutura celular baseada no estudo histológico do TVT não é conclusiva (BLOOM et al., 1951). Foram demonstradas, repetidamente, diferenças morfológicas significativas entre células normais do cão e as células de TVT. Estas células neoplásicas contêm algumas aberrações cromossômicas muito

específicas, concluindo-se que o TVT deriva de células que sofreram uma mutação causada por um fator ainda desconhecido (BOSCOS; VERVERIDES, 2004) e que as tornam diferentes tanto no número de cromossomos, como na morfologia, quando comparados aos cromossomos normais dos cães (TINUCCI-COSTA; CASTRO, 2016). As células neoplásicas do TVT possuem 59 cromossomos, diferente das células normais do cão, que possuem 78 (NASCIMENTO; SANTOS, 2008).

Conforme Sticker (1904) descreveu, as células neoplásicas são transplantadas da superfície do tumor de um cão acometido para a superfície da mucosa genital do cão susceptível durante a cópula. As células transplantadas apresentam a capacidade de crescer e multiplicar no organismo hospedeiro (BLOOM et al., 1951). Por isso, a transmissão também pode ocorrer pelo contato direto, por meio de atrito físico, característico do comportamento reprodutivo de cães em bandos ou por meio de lambeduras ou mordidas (BIRCHARD; SHERDING, 2008). O TVT também pode acometer filhotes, pelo contato com a mãe portadora dessa afecção (VALENÇOLA et al., 2015). Sendo assim, o acometimento de outras regiões que não a genital pode ser pela via hematogênica, ou seja, por conta de metástases, ou por implantação das células neoplásicas, sendo a segunda forma a mais comum em ocasionar lesões extragenitais (LIMA, 2013).

Estudos *in vitro* demonstraram que as células tumorais têm comportamento parecido com o dos macrófagos quando cultivadas em tecido; a célula isolada apresenta-se arredondada e manifesta pinocitose ativa (BLOOM; et al., 1951). A atividade fagocítica do TVT foi sugerida por autores que observaram a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. dentro dessas células tumorais (KEGLER et al., 2013). O uso da técnica de imunohistoquímica levou à hipótese de uma origem histiocítica para o tumor venéreo transmissível (MARCHAL et al., 1997). Autores que defendiam a hipótese viral na etiologia do TVT chegaram a investigar um retrovírus tipo C (DAS; DAS, 2000). Posteriormente demonstrou-se que algumas proteínas virais poderiam ser produzidas em células tumorais (LIAO et al., 2003). Entretanto, a presença de algumas partículas virais em amostras de tumores naturais foi considerada um achado incidental (MUKARATIRWA; GRUYS, 2003). Em outro estudo, também utilizando a imunohistoquímica, demonstrou-se que as células tumorais não foram marcadas por anticorpos anti-lisozima, anti-macrófago, anti-proteína S-100 e anti-CD18, indicando que a origem dos 23 tumores avaliados não poderia ser histiocítica; esse estudo mostrou ainda que a marcação de 90% dessas células pelo anticorpo anti-vimentina, uma proteína presente principalmente em células mesenquimais, não ajudou a elucidar a sua origem (MASCARENHAS et al., 2014). Contudo, Mascarenhas et al., (2017) relataram que

foi possível visualizar a ligação de fitohemaglutinina-L (PHA-L) e concanavalina-A (Con-A) às células de TVT, lectinas que têm alta afinidade por macrófagos e células T, respectivamente, o que reforçou a hipótese de uma origem linfóide/mieloide do TVT. Ujvari et al. (2017) admitem a origem do TVT como sendo de células mielóides.

A regressão espontânea do TVT é incomum (DRUMOND; et al., 2008), quando ocorre, a resolução se dá entre 6 e 9 meses após a manifestação da doença (UJVARI et al., 2016). Em estudos experimentais foi possível notar que após implantação no tecido suscetível, as células de TVT passam por um período de progressão, um período de crescimento e logo depois, a fase de regressão tumoral (TINUCCI-COSTA; CASTRO, 2016). O infiltrado de leucócitos (com grande quantidade de linfócitos, alguns eosinófilos e poucos macrófagos) no tumor pode ter relação direta com a rejeição deste pelo organismo do hospedeiro, demonstrando que a resposta imunológica tem um papel importante em sua regressão. Nota-se, por exemplo, a baixa expressão de antígenos MHC I e II na fase de progressão e um aumento gradual na fase de regressão. No tecido do tumor em progressão nota-se células tumorais íntegras, já no tumor em regressão essas células estão degeneradas, com mudança de formato, semelhantes a fibroblastos, com aumento do infiltrado de leucócitos e de tecido conjuntivo (TINUCCI-COSTA; CASTRO, 2016). Demonstrando que o tumor tem propriedades antigênicas (MUKARATIRWA; GRUYS, 2003), assim, a disseminação e formação de metástases são atribuídas a condições de imunossupressão (ACEÑA; VILLEGAS, 2007).

Demonstrou-se que existe uma apresentação insuficiente de antígenos tumorais pelo MHC na superfície das células de TVT, o que faz com que o tumor escape à vigilância imunológica das células NK (do inglês *natural killer*, ou matadoras naturais) e de linfócitos T citotóxicos e auxiliares (MUKARATIRWA; GRUYS, 2003). As células de TVT na fase de progressão do tumor não expressam antígenos MHC de classe I ou II, entretanto, durante a regressão, cerca de 30 a 40% das células tumor expressam esses antígenos (YANG et al., 1987). Portanto, a reexpressão do MHC na fase de regressão do tumor talvez seja responsável pela sua regressão espontânea após a fase de progressão (MUKARATIRWA; GRUYS, 2003; UJVARI et al., 2016). Vural et al. (2018), utilizando marcadores CD3, CD4, CD8, D79 e TGF- $\beta$ , evidenciaram que o CD3<sup>+</sup>, CD79<sup>+</sup> e o CD8<sup>+</sup> estavam mais presentes na fase de regressão do tumor (após início do tratamento quimioterápico) do que na fase de progressão. Já o CD4<sup>+</sup> foi encontrado principalmente na fase de progressão tumoral. O TGF- $\beta$  foi encontrado em todas as fases, tanto progressão como regressão. Os autores relatam que a liberação da citocina TGF- $\beta$  na fase de regressão é importante para regressão tumoral, assim

como, a infiltração dos linfócitos T e B no tecido do tumor (Vural et al., 2018).

À medida que o TVT regride e evolui para a cura, as análises citológicas evidenciam células tumorais já não tão características e um aumento de células inflamatórias, principalmente linfócitos, e também a presença de tecido conjuntivo fibroso (DRUMOND et al., 2008; OTTER et al., 2015). Além disso, pode-se visualizar microscopicamente células em apoptose, que pode ser consequência da secreção de citocinas, como TNF $\alpha$ , isquemia discreta ou ativação do mecanismo imunocelular (SANTOS et al., 2001). Um cão acometido naturalmente ou experimentalmente pelo tumor assim como os filhotes de mães que tiveram TVT, podem se tornar imunes a doença (TINUCCI-COSTA e CASTRO, 2016).

Um dos fatores de grande importância para a regressão do TVT é a apoptose das células tumorais (SANTOS et al., 2005). A presença de infiltrados inflamatórios é mais frequente em TVTs que estão em regressão do que naqueles que estão em crescimento, o que é um indicativo que as células inflamatórias têm influência na indução da morte celular (SANTOS et al., 2005). Acredita-se que a citotoxicidade das células T está relacionada a esse fato e que aumenta nesta fase (MUKARATIRWA; GRUYS, 2003). Nos cães que não são capazes de montar uma resposta biológica adequada, o tumor pode continuar crescendo e, em alguns casos, ocasionar metástases (RANI; PAZHANIVEL, 2015). Naturalmente, as formas mais graves da doença ocorrem com mais frequência em cães abandonados, maltratados, portadores de outras doenças ou que vivem em ambientes insalubres, condições essas associadas à baixa capacidade imunológica (BOSCOS; VERVERIDES, 2004). Comorbidades como infecção simultânea por *Erlichia* sp (BRANDÃO et al., 2002) e *Leishmania* (CATONE et al., 2003), que resultam em imunomodulação, ou tratamento prolongado ou com doses imunossupressoras de corticosteroides têm sido relatados como fatores que afetam a resposta imunológica do cão acometido por TVT (BOSCOS; VERVERIDES, 2004).

#### 4.3. APRESENTAÇÃO CLÍNICA DO TVT EM CÃES

Em geral as lesões tumorais apresentam-se bastante friáveis, podendo manifestar-se com lesões múltiplas ou únicas (MOSTACHIO et al., 2007), aspecto de couve-flor, com secreção sanguinolenta (SOUZA; MENDONÇA, 2009; FERNANDES et al., 2013), úlceras (FILGUEIRA, 2010), volume da genitália aumentado, alteração do arcabouço da parede vulvar, exteriorização da lesão, lesões no bulbo e dificuldade para expor o pênis (HUPPES et

al., 2014). As lesões proliferativas surgem como uma massa de forma irregular e avermelhada na mucosa peniana em machos, ou no vestíbulo, vulva ou vagina de cadelas (BICHARD; SHERDING, 2008). É comum apresentar infecção bacteriana secundária, necrose, além de odor desagradável (FILGUEIRA, 2010), podendo haver dor intensa, principalmente se houver miíases no local da lesão (MORAES et al., 2013).

Já foram relatados casos extragenitais em locais como pele, cavidade oral e nasal ou ânus (CARVALHO et al., 2003). Estudos mencionam lesões de TVT muito atípicas como em globo ocular, em córnea, pálpebras, em terceira pálpebra, em conjuntiva uni ou bilateral, dentro do globo ocular, em conduto auditivo e em extremidade de membro torácico. Há relatos também em linfonodos submandibulares, no palato, na mama e na região perianal, onde dos 203 cães naturalmente acometidos por TVT, 47 (23,15%) apresentaram o tumor exclusivamente na região extragenital (PEIXOTO et al., 2016).

Em casos de tumor em cavidade nasal, os sinais clínicos podem ser aumento de volume, secreção nasal purulenta, dispneia, epistaxe ou secreção serossanguinolenta (SILVA et al., 2007b; HUPPES et al., 2014). Em casos mais graves pode haver comprometimento ósseo, como lise e aumento da trabeculação do osso nasal (CRUZ et al., 2009). A localização do TVT em áreas como da mucosa nasal, pode se dar pelo hábito dos cães de se identificarem cheirando as regiões genitais, e desta forma células tumorais são transplantadas através da inspiração (GUREL et al., 2002). O TVT cutâneo pode se apresentar sob a forma de nodulações dérmicas e subcutâneas, com aproximadamente 5 cm de diâmetro, consistência firme, em várias partes do corpo, como na cabeça, no dorso, no pescoço e na região inguinal. (HORTA et al., 2012). Em geral, o TVT apresenta-se circunscrito, em nódulos únicos ou múltiplos, bordas elevadas quando o tumor está ulcerado, com coloração brancacenta, cinza ou rosada. O centro da lesão apresenta-se avermelhado, de aspecto friável, podendo estar associado a um exsudato purulento (CASTELO-BRANCO et al., 2008). Quando localizado em cavidade oral, os sinais clínicos mais observados de TVT são dificuldade para se alimentar, fístulas oronasais, halitose e presença de úlceras (HUPPES et al., 2014), sendo possível causa de perda de dentes (FILGUEIRA, 2010).

Em ambos os sexos, outros sinais menos comuns são fraqueza, disúria, úlceras no períneo, constipação, anorexia, e perda de peso (BOSCOS; VERVERIDES, 2004). A apresentação de sinais em outros sistemas pode indicar metástases, ou gravidade da própria neoplasia associada à síndrome paraneoplásica (TINUCCI-COSTA, CASTRO, 2016) e comorbidades com doenças infecciosas (BRANDÃO et al., 2002).

Casos de metástases são raros (UJVARI et al., 2016), entretanto, foram descritos em

órgãos internos como: baço, rim, os pulmões, fígado, coração, traqueia, intestino, cérebro (BRANDÃO et al., 2002), pele (FERNANDES et al., 2013), linfonodos ilíacos internos e externos (SOUSA et al., 2000) e olhos (DAS; DAS, 2000). Há também relatos de lesões de TVT nas mamas de cadelas, que podem ocorrer por meio de metástases do tumor para a glândula, principalmente em casos de lesões primárias nos órgãos genitais que persistam por muito tempo ou por implantação das células neoplásicas (NAK et al., 2005). Além disso, os cães com metástases normalmente apresentam lesões genitais maiores do que aqueles que não têm metástase (BOSCOS; VERVERIDES, 2004).

#### 4.4 DIAGNÓSTICO

##### 4.4.1 Diagnóstico clínico, diferencial e prognóstico

O diagnóstico é feito por meio do exame clínico, que inclui anamnese, exame físico e exames complementares, como os exames de imagem e patologia clínica (BELLEI et al., 2006; BOSCO et al., 2010). Exames hematológicos, como o eritrograma e o leucograma, associados às dosagens bioquímicas séricas de proteínas totais e frações, a alaninoaminotransferase (ALT), a fosfatase alcalina (FA), bilirrubinas, ureia, creatinina, e outros elementos, além de urinálises (APTEKMANN et al., 2005; FERNANDES et al., 2013), permitem verificação das funções hepática e renal, resposta inflamatória, estado nutricional e aspectos metabólicos básicos, portanto o impacto da neoplasia sobre a saúde geral. Os exames citopatológicos e histopatológicos são considerados confirmatórios para o TVT, além de indicativos de prognóstico (MAGALHÃES et al., 2001).

Na anamnese, pode-se caracterizar práticas adotadas na criação do animal que indiquem contato com cães errantes (CARVALHO et al., 2004), acesso ou facilitação à reprodução, informações sobre a evolução da neoplasia, localização e condutas terapêuticas prévias (GASPAR, 2005).

Ao exame físico pode-se analisar criteriosamente a região afetada, as dimensões do tumor, além de inspecionar os linfonodos regionais (GASPAR, 2005), pela sua disseminação mais frequente nos linfonodos regionais do que nas vísceras (CRUZ et al., 2009). Nos machos, a queixa mais comum do guardião é o sangramento peniano. Podem ser detectadas lesões neoplásicas na mucosa do prepúcio e parafimose (BOSCOS; VERVERIDES, 2004).

O eritrograma comumente indica anemia, associada à perda sanguínea devido à característica friável do tumor (SIMERMANN, 2009). O leucograma costuma revelar leucocitose, muitas vezes com desvio à esquerda, atribuída a infecções bacterianas secundárias (SILVA et al., 2007b). Uma trombocitopenia também pode ser observada em alguns casos, e está associada à perda contínua de líquido serossanguinolento ou a mecanismos que tenham relação com o sequestro de plaquetas ou o consumo destas, que são características encontradas em paciente com neoplasias em geral (APTEKMANN et al., 2005).

O diagnóstico diferencial deve ser feito com base na observação clínica do animal, ou seja, se há lesão característica de TVT em região genital e na análise citológica do tumor (HORTA; QUESSADA, 2014). Deve-se considerar que o caráter contagioso dessa neoplasia é um dos aspectos que o diferem de outros sarcomas de células redondas (BATISTA et al., 2007), como o mastocitoma, o histiocitoma ou o linfoma maligno (OTTER et al., 2015), o melanoma amelanótico (MASCARENHAS et al., 2014) e o plasmocitoma (GORENSTEIN et al., 2016). Algumas neofomações podem ter aspecto macroscopicamente semelhante ao do TVT (FILGUEIRA, 2010), sendo possível sua diferenciação no exame citológico (HORTA; QUESSADA, 2014). O TVT tem que ser considerado no diagnóstico diferencial em cães que apresentam ronco, epistaxe, secreção nasal e angústia respiratória (MIRANDA et al., 2011). Como apresenta características destrutivas e potencial metastático na cavidade nasal, o TVT deve ser incluído na investigação clínica e patológica diferencial para neoplasias dessa região nasal (SILVA et al., 2007b). As neoplasias mamárias também devem ser incluídas, visto que o TVT muitas vezes pode apresentar-se sob a forma de nódulos na região da mama (HORTA; QUESSADA, 2014).

O diagnóstico de metástases de TVT em cavidades é realizado também por meio de exames de imagem, como ultrassonografia, exame radiográfico ou tomografia computadorizada (AFONSO et al., 2004; DALECK et al., 2004). A laparotomia exploratória é realizada quando outros exames mais conservativos são inconclusivos (AFONSO et al., 2004). O prognóstico do TVT frequentemente é favorável, entretanto torna-se reservado nos casos em que o tumor apresenta resistência aos quimioterápicos e quando há metástases (DALECK et al., 2004). Fatores como doenças concomitantes e o ciclo estral devem ser levados em consideração antes de traçar o prognóstico do tumor, já que influenciam no estado imunológico do paciente canino e na sua capacidade de responder bem ou não ao tratamento (PARANZINI et al., 2015). O envolvimento de outros sistemas indica maior gravidade do TVT. As apresentações extragenitais devem ser criteriosamente investigadas, pois estas, por



estarem em locais menos comuns, podem ser confundidas com outras doenças, levando a um diagnóstico tardio e conseqüentemente um prognóstico reservado ou ruim (FILGUEIRA et al., 2013).

A localização do TVT em locais como o coração, olho, cérebro e pulmão desfavorecem o prognóstico do tumor, devido ao comprometimento de órgãos vitais e à redução da qualidade de vida dos cães (BATISTA et al., 2007). Quando o cão apresenta sinais neurológicos, como demência e desorientação, indicando metástases para o sistema nervoso central, o prognóstico é desfavorável (SILVA et al., 2007; FERNANDES et al., 2013). A explicação é que as células tumorais podem afetar órgãos distantes da lesão inicial pela via hematogena ou linfática (FERNANDES et al., 2013).

#### **4.4.2 Citopatologia e histopatologia**

##### *4.4.2.1 Técnicas de amostragem do tumor para diagnóstico laboratorial*

Os métodos de coleta de amostras para análise citológica incluem o decalque (do inglês *imprint*) e a citologia aspirativa por agulha fina (PAAF), além do *swab*, todos considerados confiáveis, rápidos, e de baixo custo (ECHER et al., 2015; FILGUEIRA et al., 2013). A citologia aspirativa por agulha fina é um método rápido e requer materiais simples para sua execução, como seringa descartável e uma agulha fina e trata-se de um método bastante confiável (PELETEIRO et al., 2011). A utilização de agulha 25x7 acoplada a uma seringa de 12ml com 2ml de ar foi utilizada na PAAF, para diagnóstico de diversos tumores, inclusive TVT (MAGALHÃES et al., 2001). O decalque é mais utilizado em casos de tumores mais celulares, diminuindo os riscos de ruptura celular, não sendo usado em lesões pouco esfoliativas e caracteriza-se pelo contato da lâmina diretamente com a lesão (MAGALHÃES et al., 2001). Quando o tumor está ulcerado, pode haver contaminação com bactérias (PELETEIRO et al., 2011), mas é facilmente executado e de rápido diagnóstico por citologia (SOUSA et al., 2000). O *swab* demonstrou também ser uma técnica eficiente para colher amostras para o diagnóstico citológico de TVT (ROCHA et al., 2008), porém é uma técnica mais delicada, pois causa apenas uma leve escarificação da lesão (PELETEIRO et al., 2011). Quando o *swab* atinge as bordas da lesão, o material é transferido para uma lâmina histológica (OLIVEIRA et al., 2008).

O exame histopatológico deve ser feito em amostras obtidas por biópsia e permitem um diagnóstico mais conclusivo (SOUZA et al., 2006; SILVA et al., 2007a; MAGALHÃES et al., 2001).

#### *4.4.2.2 Aspectos citológicos e histológicos do TVT*

No exame citológico, o TVT pode apresentar numerosas células arredondadas individualizadas (OLIVEIRA et al., 2009) com núcleos arredondados ou ovais e nucléolo único e proeminente apresentando cromatina grosseira. O citoplasma apresenta-se escasso, normalmente de cor azul claro, finamente granular, homogêneo, podendo conter vacúolos (AGNEW; MACLACHLAN, 2017). Podem estar presentes figuras de mitose, assim como neutrófilos em variados graus de degeneração (OLIVEIRA et al., 2009). As diversas figuras de mitose encontradas na citologia demonstram a alta taxa de proliferação do tumor (AMARAL et al., 2004). As mitoses podem apresentar-se de forma atípica, cromatina com padrão grosseiro, nucléolo único e evidente e binucleação, se enquadram em características de malignidade do tumor (HORTA; QUESSADA, 2014). Alguns outros fatores de malignidade incluem anisocariose, micronucleação, macrocariose, brotamentos, espículas nucleares, núcleo reniforme, pseudoinclusões, hipercromia, arranjo polar, lobulação nuclear e amoldamento nuclear; e os fatores citoplasmáticos incluem células vacuolizadas, corpúsculos linfoglandulares, projeções citoplasmáticas, espessamento de membrana citoplasmática, anisocitose, eosinofilia citoplasmática, fagocitose (VALENÇOLA et al., 2015). No exame pode-se visualizar figuras de apoptose e também infiltrado de linfócitos e plasmócitos (SANTOS et al., 2001; VALENÇOLA et al., 2015). A presença de linfócitos na citologia aumenta após o tratamento com quimioterapia, podendo ser considerado um fator que indique a regressão do tumor (GONZÁLEZ et al., 2000).

O exame citológico permite também a observação dos diferentes padrões morfológicos do TVT (AMARAL et al., 2004). O TVT pode ser caracterizado citomorfologicamente em linfocitoide, plasmocitoide ou linfoplasmocitoide, este último também denominado como misto. O padrão plasmocitoide é caracterizado por apresentar um mínimo de 70% de células de morfologia ovoide, com núcleo excêntrico e uma menor relação núcleo/citoplasma. Para caracterizar o padrão linfocitoide, é preciso que haja pelo menos 70% de células mais arredondadas, com núcleo central arredondado e uma maior relação núcleo/citoplasma. Quando os dois tipos celulares estão presentes em uma porcentagem menor do que 70%, o

TVT é classificado como linfoplasmocitoide (AMARAL et al., 2004). A morfologia plasmocitoide do tumor é associada a um maior grau de agressividade, como também maior resistência ao tratamento com quimioterápicos, principalmente se estiver associado à ausência de infiltrado inflamatório linfocitário, sendo mais comum em áreas extragenitais (AMARAL et al., 2004). Pode-se observar vacúolos no citoplasma, núcleo com cromatina grosseira e que o número de células tumorais diminui consideravelmente depois de instituído o tratamento quimioterápico (VURAL, et al., 2018) além do infiltrado de leucócitos e neutrófilos (LAPA, 2009). Os vacúolos presentes nas células de TVT são o diferencial do TVT das demais neoplasias de células redondas (SANTOS et al., 2001). Entretanto, a ausência dos vacúolos na presença das demais características micro e macroscópicas sugestivas de TVT não inviabiliza o diagnóstico. Um estudo atribuiu à microscopia citológica um índice de 94,6% de eficiência no diagnóstico de TVT (BRANDÃO et al., 2002).

O exame histopatológico se mostra eficiente porque detalha a arquitetura da neoplasia e seu processo, além das suas relações com os tecidos circunjacentes e caracteriza melhor as variações de diferenciação e os tipos celulares, que às vezes não são bem estabelecidos na citologia, mas são importantes para a definição do prognóstico (AMARAL et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2001). As características observadas ao exame histopatológico mostram uma neoplasia de células redondas, constituída por uma grande quantidade de células de núcleo redondo a ovóide, com cromatina irregular, citoplasma abundante, eosinofílico-granuloso (MARTÍNEZ et al., 2002), o núcleo apresenta-se ovalado e pode estar central ou excêntrico (CRUZ, et al., 2009). São também descritas altos índices de figuras de mitose (GOLDSHMIDT; HENDRICK, 2002). As células são apoiadas sobre tecido conjuntivo fibroso, escasso e delicado (FERNANDES et al., 2013) e podem apresentar-se levemente pleomórficas, com nucléolos evidentes (AMARAL et al., 2012), núcleos grandes hiper ou hipocromáticos e citoplasma anfofílico (VURAL et al., 2018). Porém, a aparência do tumor na histologia pode mudar a depender do seu estágio de regressão ou crescimento (AGNEW; MACLACHLAN, 2017).

As células têm aspecto semelhante à linfoblastos ou plasmócitos, sendo possível visualizar estroma fibrovascular em maior quantidade em tumores instalados a mais tempo do que nos tumores recentes e infiltrados de linfócitos e também outras células inflamatórias são encontrados em tumores que regredem espontaneamente (AGNEW; MACLACHLAN, 2017). Nos tumores em regressão é possível observar aumento das zonas de necrose e fibrose (GOLDSHMIDT; HENDRICK, 2002). As populações de células redondas podem se dispôr em cordões (CRUZ et al., 2009) ou linhas, e normalmente apresentam contornos indistintos

(GOLDSHMIDT; HENDRICK, 2002). A vascularização e a fibrose aumentam após início do protocolo quimioterápico (VURAL, et al., 2018). Infiltrado inflamatório contendo linfócitos e plasmócitos (VALENÇOLA et al., 2015), assim como a visualização de material proteináceo, podem sugerir um melhor prognóstico por indicar regressão do tumor (LAPA, 2009).

#### 4.5 TRATAMENTO DO TVT POR QUIMIOTERAPIA

O tratamento do TVT tem como objetivo a remissão completa da lesão, assim como evitar o desenvolvimento de lesões metastáticas e recidivas. A quimioterapia é o tratamento de escolha para o TVT, independentemente da extensão, do tamanho da neoplasia, ocorrência de metástase ou da duração da doença (BOSCOS; VERVERIDES, 2004). Outras modalidades de tratamento, como a radioterapia e a criocirurgia são citadas, mas não são utilizadas com frequência no Brasil devido ao seu alto custo (SOUSA et al., 2000). O uso de quimioterápicos produz uma boa resposta tanto para tumores únicos como para os múltiplos, podendo-se utilizar um único fármaco antineoplásico ou associações (BIRCHARD; SHERDING, 2008). Os tumores de padrão linfocitoide frequentemente apresentam uma resposta completa à quimioterapia, enquanto o TVT plasmocitoide é menos sensível e em alguns casos responde apenas parcialmente (FLORÉZ et al., 2014).

A vincristina é a droga de primeira escolha, por apresentar um alto índice de eficiência como droga única (CARVALHO, 2010). O protocolo mais usado é a administração da vincristina uma vez por semana, porém há casos de resistência tumoral a esse medicamento (TINUCCI-COSTA, 1999). A associação da vincristina com a ciclofosfamida aumenta consideravelmente os índices de cura nos casos resistentes, sendo que a primeira tem como função inibir a mitose celular e a segunda interfere na síntese de DNA das células tumorais (CANAL et al., 2005). Estudos relataram o uso da ciclofosfamida e do metotrexato como única droga para tratamento de TVT e em nenhum dos dois protocolos foi obtida resposta terapêutica satisfatória (AMBER et al., 1990). Além da pouca eficiência não existe benefício financeiro em usar a ciclofosfamida e metotrexato quando comparados ao custo da vincristina (RAMADINHA et al., 2016).

A doxorubicina pode também ser utilizada como alternativa, em casos de tumores que apresentem resistência à vincristina (BOSCOS; VERVERIDES, 2004). Porém o seu uso causa diversos efeitos colaterais, como citotoxicidade, alterações gastrointestinais, cardiotoxicidade e reações de hipersensibilidade (VIÉRA, 2015). A vimblastina foi

considerada também uma droga eficiente e segura como alternativa ao uso da vincristina, mas o custo ainda é um fator limitante, visto que chega a ser 2 a 5 vezes mais elevado (RAMADINHA et al., 2016). Em geral, neoplasias não primárias têm maiores chances de apresentarem resistência ao tratamento quimioterápico (GASPAR, 2005).

Ao longo do curso de tratamento, é possível observar a regressão do tumor, avaliando o seu tamanho semanalmente, sempre antes da próxima aplicação de quimioterápico (OTTER et al., 2015). O exame citológico deve ser feito para acompanhar a evolução do tratamento (SIMERMANN, 2009). Se exames não forem possíveis é recomendado que se repita o protocolo antineoplásico em uma dose extra após o desaparecimento macroscópico das lesões (LAPA, 2009).

#### **4.5.1 A vincristina na quimioterapia do TVT**

A vincristina é um alcaloide da vinca (*Catharanthus roseus*) (Figura1), uma planta originária de Madagascar (BRANDÃO et al., 2010) que atualmente é cultivada em várias regiões tropicais e subtropicais (PACHECO, 1980), e no Brasil é conhecida popularmente como “boa noite” ou vinca-de-gato” (MARCHINI et al., 2001).

A vincristina é um fármaco considerado de baixa toxicidade e baixo custo, sendo aceita por grande parte dos guardiões. A eficácia da vincristina pode chegar aos 90%, havendo remissão completa e ausência de recidivas (NELSON; COUTO, 2010). Os efeitos adversos atribuídos à vincristina incluem, principalmente, mielossupressão e alterações gastrointestinais (SAID et al., 2009).

O sulfato de vincristina deve ser administrado em cães exclusivamente pela via intravenosa (IV), nas doses de 0,5 a 0,7mg/m<sup>2</sup> de superfície corporal ou 0,0125 a 0,025mg/kg, em intervalos semanais. Hemogramas devem ser realizados antes de cada aplicação, para monitorar o efeito mielossupressivo do quimioterápico (CENDOROGLO et al., 2013; ECHER et al., 2015). Estudos demonstraram que a dose de 0,025mg/kg IV promoveu regressão significativa da lesão logo após primeira aplicação, e a dose de 0,75mg/m<sup>2</sup> promoveu regressão completa após a quinta aplicação (RODRIGUES; et al., 2001; DUARTE et al., 2006). O protocolo básico de uso da droga estabelece que devem ser realizadas mais duas aplicações após a resolução do tumor e regressão total das lesões, sendo que o tempo do tratamento dura em média de 4 a 6 semanas (NELSON; COUTO 2010). O sucesso da quimioterapia antineoplásica pode ser comprometido se houver interrupção por mais de duas

semanas (BOSCOS; VERVERIDES, 2004).

Os efeitos adversos da vincristina podem ocorrer nas doses terapêuticas 0,05mg/kg ou 0,75mg/m<sup>2</sup> ou acima delas, podendo causar mielossupressão, constipação, neurotoxicidade periférica, dor muscular, íleo paralítico e irritação severa se extravasar para o meio perivascular (VIANA, 2014). A mielossupressão causada pela vincristina reflete-se na redução das contagens de glóbulos brancos no hemograma, e pode ser revertida quando o tratamento é suspenso (BOSCOS; VERVERIDES, 2004). Menos de 2% dos casos apresentam uma leucopenia mais grave, sendo necessário tratamento adjuvante ou até mesmo suspensão de uma ou mais sessões de quimioterapia (BOSCOS; VERVERIDES, 2004). Queda de pêlo, lesão tecidual, flebites, celulites e necrose grave são alguns dos efeitos mais frequentes causados pelo uso ou pela técnica de aplicação da vincristina (CANAL et al., 2005). Assim, é importante avaliar o estado de saúde do animal antes de iniciar o seu tratamento com vincristina (VALADÃO; METZE, 2010).

#### 4.5.2 Mecanismo de ação e farmacocinética da vincristina

A vincristina atua se ligando às  $\beta$ -tubulinas, causando uma inibição da polimerização dos microtúbulos, o que leva ao bloqueio mitótico e a apoptose das células (JORDAN; WILSON, 2004; BRANDÃO et al., 2010).

Figura 1 – Aspecto botânico de *Catharanthus roseus*, conhecida popularmente como “vinca rósea”, notar a variedade das cores das flores da planta (rosa, roxo e branco).



Fonte: Moudi et al., (2013).

Estudos feitos por Hantrakul et al. (2014), analisando a farmacocinética da vincristina em cães sob tratamento para TVT natural, detectaram o fármaco no plasma dos cães até 120 minutos após a aplicação do mesmo. A avaliação foi feita utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de massa-massa (LC/MS/MS). Ainda

segundo Hantrakul et al. (2014) a concentração inicial estimada no plasma, logo no momento da aplicação de vincristina foi de  $119 \pm 18,0$  ng/ml, a meia-vida de distribuição foi de  $21,5 \pm 6,90$  minutos, a meia-vida de eliminação foi de  $47,6 \pm 14,2$  minutos, o *clearance* foi de  $0,010 \pm 0,001$  l/min/kg, e o volume de distribuição foi de  $0,660 \pm 0,210$  l/kg. Assim, a concentração plasmática da vincristina nesses cães chegou a níveis muito baixos cinco minutos após a aplicação do fármaco, sendo que após cerca de cinco horas da aplicação 99% do fármaco já não estavam presentes no plasma sanguíneo e a meia-vida de distribuição foi mais longa nos cães com TVT do que naqueles que não apresentavam a doença. Isso demonstra que a vincristina é distribuída para os tecidos periféricos de cães portadores dessa neoplasia porque há uma maior absorção de vincristina pelos tecidos ricos em tubulina, onde há maiores taxas mitóticas, como é o caso do TVT. O estudo demonstrou que a maior parte dos cães apresentou redução de mais de 50% do tamanho do tumor somente na primeira aplicação (HANTRAKUL et al., 2014). Esses mesmos autores demonstraram que houve uma rápida eliminação, conseqüentemente o não acúmulo da droga, e também uma boa resposta ao tratamento com vincristina, em aplicações semanais.

#### **4.5.3 Resistência do TVT canino à vincristina e a glicoproteína-P**

Os casos de resistência do TVT ao quimioterápico frequentemente incluem os tumores extragenitais, ou aqueles que tendem a responder mais lentos ao tratamento, como os TVTs de padrão citológico misto e plasmocitóide (FILGUEIRA, 2010). Os casos resistentes de cães tratados não apresentam melhora satisfatória após a sexta ou mais aplicações do fármaco (BUENO et al., 2003; CIALINI et al., 2014).

Vários fatores estão ligados aos mecanismos de resistência dos tumores ao tratamento com quimioterápicos e também com seu comportamento biológico (FLORÉZ et al., 2014). Existem alguns fenômenos que influenciam nesses processos, como por exemplo, a superexpressão da glicoproteína-P (Pg-P) na membrana das células, que é responsável pelo efluxo de drogas de dentro para fora da célula tumoral e os genes da família BCL-2 (pró e antiapoptóticos), associados a processos de diferenciação e de divisões rápidas, e também mecanismos de reparo do DNA relacionados com o TP53 (FLORÉZ et al., 2014). Observou-se que os TVTs com padrão plasmocitóide, que têm maior resistência ao tratamento com vincristina, também apresentam maior expressão de glicoproteína-P (GASPAR, 2005), por isso são menos sensíveis a quimioterapia (FLÓREZ et al., 2014).

A glicoproteína-P é codificada por um gene de resistência a múltiplos fármacos (MDR-1), e é responsável pela influência na farmacocinética e na farmacodinâmica de uma droga em um indivíduo ou espécie (AZEREDO et al., 2009). O sistema é um mecanismo de proteção celular contra xenobióticos às células de mamíferos (HUBER et al., 2010). A glicoproteína-P atua em diversas espécies de procariotos e eucariotos, garantindo às células uma resistência intrínseca a uma grande quantidade de fármacos (SILVA et al., 2011). Isso explica a resistência de agentes patogênicos ao tratamento com fármacos antimicrobianos e antiparasitários (MANI et al., 2016). Por outro lado, a presença de glicoproteína-P na barreira hemato-encefálica e no intestino, por exemplo, promove a eliminação, de forma ativa, de fármacos do sistema nervoso central e do trato intestinal, e também limita a absorção gastrointestinal de fármacos (LINARDI; NATALINI, 2006). Está presente ainda nos testículos, na placenta, células epiteliais tubulares biliares ou tubulares renais, ajudando na excreção e distribuição do fármaco no organismo (MEALEY; FIDEL, 2015). Acredita-se que o efluxo de uma molécula no enterócito é feito pela glicoproteína-P diversas vezes, assim a enzima tem várias oportunidades para metabolizar um fármaco evitando que ele chegue intacto a corrente sanguínea, porém, se houver inibição da glicoproteína-P o fármaco passará uma única vez pelo enterócito causando uma diminuição no metabolismo intestinal (BENET, 2009).

Esta proteína tem como função transportar os fármacos para fora das células, até que cheguem a níveis citoplasmáticos tão baixos que não sejam capazes de causar a morte celular. Estudos com marcação de anticorpos antiglicoproteína-P mostraram que os TVTs que têm morfologia plasmocitoide têm uma imunorreatividade maior se forem comparados aos do tipo linfocitoide, considerando isso, pode-se concluir que os tumores de aspecto plasmocitoide têm maior potencial de expressar a glicoproteína-P e então, maior resistência às drogas (FLORÉZ et al., 2014).

Estudos realizados com imuno-histoquímica com glicoproteína-P, MRP1 (resistência a múltiplas drogas- associada à proteína 1), GSTpi (glutathione-S-transferase pi) para marcar células de TVT, antes do tratamento quimioterápico e naqueles que tinham sido relatados como resistentes, mostraram que houve expressão de todos os marcadores nas células tumorais, porém os marcadores para glicoproteína-P e MRP1, foram expressos de maneira intensa nas células tumorais antes de receberem o quimioterápico e naquelas que demonstraram resistência ao tratamento (GERARDI et al., 2014).

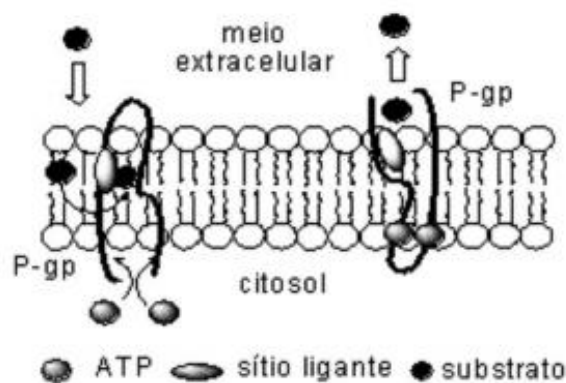
Em humanos, o uso concomitante de vincristina com antibióticos macrolídeos, lopinavir, itraconazol, inibidores fortes e moderados da citocromo P450 3A4 (CYP3A4),



inibidores da monoamina oxidase (MAO), ou inibidores da glicoproteína-P aumentam os efeitos citotóxicos da vincristina (CENDOROGLIO et al., 2013).

A glicoproteína-P é uma proteína com porção extra, intra e transcelular, que possui alto peso molecular e a conformação espacial atravessa a membrana plasmática várias vezes (BEZERRA, 2011), sendo esse processo ATP-dependente (Figura 2) (GOTTESMAN; PASTAN, 1993).

Figura 2- Glicoproteína-P em um modelo proposto por Higgins para explicar sua atuação



Fonte: Huber et al., (2010).

Algumas das medicações que podem ser usadas em conjunto com a vincristina para o tratamento do TVT, potencializando a sua eficácia, como é o caso da ivermectina (LAPA, 2009), que atua inibindo a glicoproteína-P (MEALEY; FIDEL, 2015) ou a ciclofosfamida (FILGUEIRA, 2010), que cria ligações cruzadas de DNA causando a quebra dos seus filamentos (ETTIGENR; FELDMAN, 2008), ou também o metotrexato (AMBER et al., 1990).

#### 4.5.4 A ivermectina como fármaco de interação com a glicoproteína-P

A ivermectina, fármaco da família das lactonas macrocíclicas (LESPINE et al., 2006), por ser substrato, age inibindo a glicoproteína-P (POULIOT et al., 1997) e apresenta uma potente ação antiparasitária em animais, inclusive cães (CANGA et al., 2009). A ação da ivermectina contra helmintos se dá por inibição da ação dos neurônios pelo GABA (ácido gama-aminobutírico) levando a uma hiperpolarização de neurônios e conseqüentemente

inibição da transmissão nervosa, o que leva à paralisia, morte e eliminação dos enteroparasitos nas fezes. (SARTOR; BICUDO, 1999). Esta droga é bastante utilizada na rotina clínica veterinária (PARADIS, 1998). As doses antiparasitárias em cães, em torno de 0,4-0,6mg/kg, são bem toleradas pela maioria dos cães, excetuando-se algumas raças susceptíveis (VIANA, 2014). Esse aspecto oferece perspectivas para o uso de ivermectina ou de seus derivados não tóxicos como agentes de reversão da resistência a múltiplos fármacos (LESPINE et al., 2006).

Existem diversos estudos para se tentar entender a interação da glicoproteína-P com os diversos substratos e assim modular sua atividade. Cada substrato é específico para uma região da molécula, então quando um substrato se liga à sua região específica, ocorre um estímulo da ATPase gerando uma mudança conformacional, o que vai ocasionar no transporte e liberação do substrato para o outro lado da membrana plasmática (BEZERRA, 2011).

A interação da ivermectina com a glicoproteína-P se dá pela afinidade da ivermectina com esta proteína, disputando a ativação da enzima ATPase (LESPINE et al., 2006). A ivermectina interage com a glicoproteína-P diminuindo a resistência à quimioterapia (LESPINE et al., 2006). A ação inibitória da glicoproteína-P pode ocorrer de duas formas: Competição com os sítios de ligação de fármacos, que são os inibidores competitivos ou bloqueio do processo de hidrólise do ATP (HUBER et al., 2010), considerados inibidores não-competitivos. Desta forma, a ivermectina funciona como um substrato, inibindo a ação dessa glicoproteína (BEZERRA, 2011).

Alguns cães apresentam um alelo mutante MDR 1 (-) do gene ABCB1 levando a uma deficiência da glicoproteína-P (BEZERRA, 2011), e conseqüentemente maior sensibilidade a determinados fármacos, que produzem toxicidade mesmo em doses terapêuticas nesses animais. Sabe-se que cães de algumas raças podem apresentar sinais de intoxicação quando tratados com ivermectina, ou outras drogas que funcionam como substrato da glicoproteína-P (loperamida, por exemplo) devido a essa mutação gênica (MEALEY et al., 2002). Isso ocorre porque a glicoproteína-P é um componente importante da barreira hematoencefálica, e dessa forma ocorre uma maior concentração de ivermectina no cérebro, causando neurointoxicação mesmo quando esses animais recebem doses consideradas terapêuticas para a espécie canina (GOKBULUT et al., 2006). As raças sensíveis incluem o Collie, *Whippet Longhaired*, *Sheepdog Shetland*, Pastor Australiano em Miniatura, Pastor Australiano, *Wäller*, Pastor Suíço Branco, *Old English Sheepdog* e Border Collie, entre outras (GRAMER et al., 2011). Essas raças podem receber outro derivado das avermectinas, como a moxidectina (VIANA, 2014). Em contrapartida, a associação de fármacos antineoplásicos e inibidores da glicoproteína-P podem levar a um quadro de toxicose grave, isso ocorre porque o uso de

inibidores atua de forma semelhante a um animal que possui deficiência genética de glicoproteína-P e por isso devem ser usados com cautela (MEALEY; FIDEL, 2015).

Além da interação com a glicoproteína-P, existem outros mecanismos de ação antitumoral associados à ivermectina. Esta droga age ocasionando o influxo de cloreto levando à morte e hiperpolarização das células tumorais; age também inibindo a via quinase atividade kit/alvo mamífero da rapamicina (Akt/mTOR), diminuindo a sua fosforilação gerando disfunção mitocondrial e dano oxidativo; atua nos receptores purinérgicos (P1, P2X e P2Y) causando morte celular imunogênica dentro do microambiente tumoral; promove autofagia através da inibição da serina/treonina-proteína quinase (PAK1); inibe a via de sinalização com complexo Tcf (WNT-TCF), levando a uma supressão do tumor; tem função de regulador epigenético (atuando no domínio SIN3); causa a inibição da helicase, levando a efeitos antitumorais, já que as helicases de RNA têm funções relacionadas ao processamento do RNA e reduz a expressão dos genes de pluripotência: fator de transcrição em células tronco embrionárias (Nanog), fator de transcrição de ligação ao octâmero 4 (Oct4) e sexo determinante região Y – box (Sox2), correlacionados à malignidade de tumores (JUAREZ et al., 2018).

Estudo no Brasil demonstrou, através de achados citológicos e histopatológicos, que a associação da ivermectina com a vincristina, com protocolo de aplicação do quimioterápico na dose de 0,5mg/m<sup>2</sup> uma vez por semana, seguida da aplicação de ivermectina na dose de 400µl/kg por via subcutânea no mesmo momento, causa regressão mais rápida do (LAPA 2009). Essas observações levantaram a possibilidade do uso da ivermectina favorecer a diminuição da resistência tumoral à vincristina, permitindo a redução das doses desse antineoplásico, conseqüentemente a redução dos efeitos colaterais, além de reduzir o custo do tratamento (LAPA, 2009). Lopes et al., (2016), descreveram um relato de caso com desfecho satisfatório após essa associação.

Demonstrou-se em estudos *in vitro* que as avermectinas inibem efetivamente a resistência a múltiplos fármacos em células de linfocemias P388 resistentes à vincristina e em células tumorais da laringe, mesmo em concentrações não tóxicas. Hipotetiza-se que é possível selecionar a avermectina mais específica para um tipo particular de célula tumoral resistente e utilizar este fármaco na terapia desse tumor (KORYSTOV et al., 2004).

Estudos que analisaram a farmacocinética da ivermectina em cães demonstraram que durante um período de 18 dias, e no primeiro dia, nas quatro primeiras horas após a administração oral, na dose de 0,6µg/kg, a ivermectina alcançou concentração máxima no plasma sanguíneo (MAGALHÃES et al., 2016). Demonstrou-se em estudos comparativos

sobre farmacocinética da ivermectina, quando administrada pela via oral ou subcutânea (SC), que esse fármaco quando aplicado pela via SC, na dose de 200µg/kg, foi detectável no plasma sanguíneo de cães até 30 dias após a aplicação, e que o tmax, ou seja, o tempo para atingir a concentração plasmática máxima foi em média de 33,6 horas, e quando administrado pela via oral o tmax foi de 5,52 horas. A ASC (área sob a curva) demonstrou que a quantidade de ivermectina que alcança a circulação quando administrada via subcutânea é maior do que quando administrada pela via oral. A meia-vida de eliminação não apresentou diferenças significativas nas administrações oral e subcutânea (GOKBULUT et al., 2006).

O presente estudo baseou-se nas informações sobre glicoproteína-P e suas implicações no tratamento quimioterápico e em dados farmacocinéticos publicados na literatura sobre ivermectina e vincristina em cães.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Cães com suspeita de TVT de diferentes raças, idades e de ambos os sexos foram atendidos no Hospital-Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (HOSPMEV-UFBA). Todos os cães foram submetidos a exames clínicos e exames complementares laboratoriais. Os exames de imagem (ultrassonografia abdominal, Raio-x de tórax e de crânio) foram realizados nos casos que havia desconforto respiratório, neoplasias extragenitais ou resposta lenta ao tratamento. A confirmação do diagnóstico presuntivo foi feita por citologia aspirativa e a biópsia foi realizada somente em alguns casos. Os cães cujo diagnóstico foi confirmado e cujos guardiões concordaram em participar foram incluídos no estudo. Esses guardiões foram instruídos sobre as implicações e regras do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). Os critérios de inclusão foram cães confirmados através de citologia e que os guardiões tinham a possibilidade de leva-los semanalmente ao Hospital-Escola e após os guardiões assinarem o Termo de consentimento livre e esclarecido; os critérios de não inclusão foram cães não confirmados para TVT através de citologia, que vieram a óbito antes de iniciar o tratamento e que o guardião não tinha disponibilidade em levar o cão semanalmente ao Hospital-Escola.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (protocolo nº 68/2017), respeitando o bem-estar animal, de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) (Anexo 2).

### 5.2 EXAME CLÍNICO

Foi realizado o exame clínico em todos os pacientes atendidos. A anamnese foi feita com os tutores a fim de conhecer o histórico dos cães, sistema de criação (domiciliado e semi-domiciliado), tempo de evolução do tumor e principais sinais clínicos apresentados. No exame físico completo foi avaliado o estado nutricional do paciente canino, coloração das mucosas, temperatura corporal, tamanho e apresentação do tumor, gravidade da lesão,

linfonodos reativos, auscultação cardiopulmonar e palpação abdominal para avaliar aumento de órgãos abdominais.

### 5.3 ESTADIAMENTO CLÍNICO

O estadiamento clínico dos cães foi feito antes do tratamento e sete dias após cada sessão de quimioterapia até o término do tratamento com objetivo de avaliar a resposta clínica dos cães aos protocolos. A pontuação do escore foi demonstrada na Tabela 1. Diversos parâmetros foram avaliados, incluindo a deformidade anatômica. Nestes casos estavam inclusos os cães que apresentaram exposição peniana, em consequência de um tumor grande na base do pênis que em alguns casos não permitia a regressão do órgão para o prepúcio, levando a uma apresentação clínica grave, com risco de compressão e necrose do órgão genital e àqueles que desenvolveram cicatrização defeitosa por conta do TVT, que podiam apresentar, por exemplo, quadros de fimose (em machos) e até deformidade vulvar (em fêmeas).

A doença dos cães foi caracterizada de acordo com a pontuação do escore em leve ( $\leq 10$  pontos), moderada (11 a 25), severa (26 a 40) e terminal ( $\geq 41$  pontos).

Tabela 1 - Parâmetros clínicos utilizados para calcular a pontuação do escore clínico em cães diagnosticados com TVTC no HOSPMEV-UFBA, no período de janeiro de 2017 a agosto de 2018

Sinais clínicos	Escore baseado na intensidade							
	0	1	2	3	4	5	10	20
<b>Atitude</b>	Ativo	-	-	Apático	-	-	-	-
<b>Apetite</b>	Normal	Hiporexia	-	-	-	-	-	-
<b>Hidratação</b>	Normal	Desidratado	-	-	-	-	-	-
<b>Status nutricional</b>	Normal	Magro	-	-	-	-	-	-
<b>Coloração das mucosas</b>	Normal	Pálida	-	-	-	-	-	-
<b>Secreção nasal</b>	Ausência	Mucosa	Com sangue	-	-	-	-	-
<b>Secreção genital</b>	Ausência	Mucosa	-	-	-	Mucopurulenta	Necrótica	-
<b>Secreção no tumor extragenital</b>	Ausência	Serossanguinolenta ou outra	-	-	-	-	-	-
<b>Localização do tumor</b>	-	Genital	-	-	-	Genital e extragenital	Extragenital	-
<b>Número de nódulos por sítio</b>	-	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco ou mais	-	-
<b>Miíases</b>	Ausência	-	-	-	-	Presença	-	-
<b>Dor local</b>	Ausência	-	-	-	-	Presença	-	-
<b>Hemorragia</b>	Ausência	Discreta	-	Patente	-	-	-	-
<b>Metástases</b>	Ausência	-	-	-	-	-	Até um sítio	≥ dois sítios
<b>Deformidade anatômica</b>	Ausência	-	-	-	-	Presente	-	-

Fonte: Acervo do estudo

## 5.4 EXAMES LABORATORIAIS

Todos os cães realizaram hemograma para avaliar alterações no eritrograma, para avaliar presença de anemia; leucograma para avaliar leucocitose ou leucopenia e bioquímico sérico com dosagens de ALT, FA para avaliar função hepática, proteínas totais, albumina e globulina, analisando o estado imunológico; ureia e creatinina para testar função renal. Os hemogramas foram repetidos antes de cada aplicação de vincristina. Foram colhidas pelo menos 4 ml de amostras de sangue por veia jugular, cefálica ou safena, em que 2 ml foram utilizadas para hemograma e 2 ml para dosagens bioquímicas. As amostras foram processadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Federal da Bahia e em alguns casos no Centro Diagnóstico Veterinário (CitVet).

## 5.5 FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Os cães foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, um grupo tratado somente com vincristina (Grupo controle – G-Vin), outro com a vincristina associada à ivermectina (Grupo experimental – G-Iv/Vin). Estipulou-se um número mínimo de seis cães para cada grupo com base em avaliações estatísticas, em que o número mínimo de animais para estudos do tipo caso-controle são seis em cada grupo (MIOT, 2011). Tanto o Grupo controle quanto o Grupo experimental foram compostos por 10 cães de ambos os sexos (macho ou fêmea), com raça definida e sem raça definida, diferentes idades (entre 1 e 12 anos), apresentações do tumor (genital e/ou extragenital) e tamanho da lesão.

Os cães que apresentaram leucopenia, com valores de leucócitos totais abaixo de 3.500 (Valor de referência= 6.000 a 17.000) tiveram o seu tratamento suspenso temporariamente até que retornassem aos valores normais para espécie.

### 5.5.1 Grupo Vincristina (G-Vin)

Os cães deste grupo foram tratados com protocolo convencional, somente com sulfato de vincristina, em aplicações semanais de 0,5mg/m<sup>2</sup> de superfície corporal, por via endovenosa (CENDOROGLO et al., 2013), utilizando cateter e diluindo em 10ml de cloreto de sódio 0,9%, para diminuir o risco de flebites. Os pacientes foram mantidos em observação,



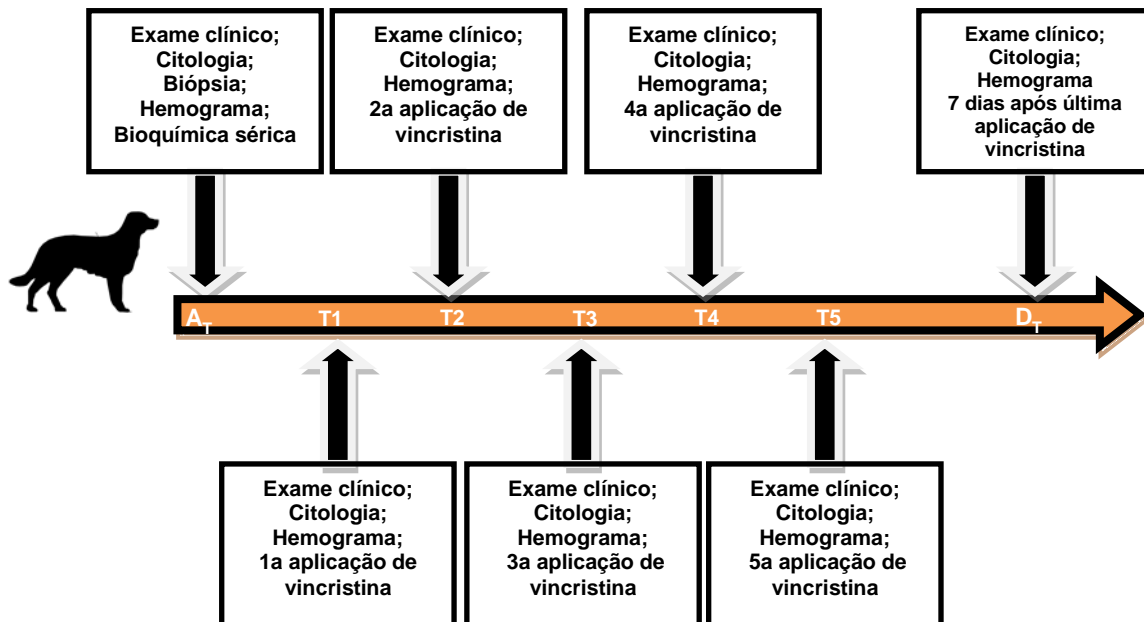
por pelo menos uma hora após a aplicação. As aplicações foram feitas a cada sete dias, até a completa regressão do tumor.

### **5.5.2 Grupo Ivermectina/Vincristina (G-Iv/Vin)**

Os cães deste grupo também foram tratados com vincristina, em aplicações semanais de 0,5mg/m<sup>2</sup> de superfície corporal, pela via endovenosa (CENDOROGLO et al., 2013), utilizando cateter e diluindo em 10ml de cloreto de sódio 0,9%, para diminuir o risco de flebites e os pacientes foram mantidos em observação por pelo menos uma hora após a aplicação. As administrações foram feitas a cada sete dias até a completa regressão do tumor. A ivermectina a 1% foi associada a este protocolo, sempre 24 a 48 horas antes da aplicação de vincristina, para que o quimioterápico fosse aplicado quando as concentrações plasmáticas de ivermectina estivessem em seus valores máximos, que segundo Gokbulut et al. (2006) era em torno de 1,40 dias, quando aplicado pela via SC. As aplicações de ivermectina ocorriam a cada 15 dias na dose 0,5mg/kg pela via subcutânea visto que, quando administrada por essa via, é detectável no plasma sanguíneo até 30 dias após a aplicação (GOKBULUT, 2006).

## 5.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 3 – Desenho experimental



Fonte: Acervo do estudo.

Os cães foram avaliados antes do tratamento, em que neste momento foram examinados e amostras biológicas foram coletadas para classificação histológica dos tumores e diagnóstico da doença. As contagens sanguíneas foram feitas a cada sete dias para avaliar se houve queda no total de leucócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos, eritrócitos, hemoglobina e plaquetas, a fim de verificar o desenvolvimento de leucopenia iatrogênica devido à ação da vincristina, até depois da última aplicação da quimioterapia ou demais alterações hematológicas causadas pelo quimioterápico. Em casos nos quais houve leucopenia, indicativa de mielossupressão, um intervalo maior entre as aplicações foi recomendado, até que os leucócitos retornassem aos valores normais para espécie. Para determinar cura do TVT e alta do tratamento, foi feita citologia das lesões semanalmente, até que não houvesse mais presença de células tumorais ou lesão macroscópica. Nos casos em que ainda havia lesão, supostamente por cicatriz do tumor e que não havia mais presença de células tumorais (na citologia), foi feita mais uma aplicação de vincristina por segurança.

Os exames citológicos foram feitos para diagnóstico e diferenciação citomorfológica e semanalmente com intuito de acompanhar regressão tumoral. Os exames histopatológicos foram feitos somente para fins diagnósticos (com diferenciação dos tipos celulares) e somente nos cães em que o tutor autorizou o procedimento.

## 5.7 ANÁLISE CITOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA

### 5.7.1 Citologia

Para avaliação citológica foram colhidas, pelo método PAAF (Punção aspirativa com agulha fina) em média três amostras/caso. A punção foi feita com agulha fina com calibre entre 25x0,7, 0,45x13 ou 20x0,55mm (Figura 4) e o material biológico transferido para uma lâmina de vidro com extremidade fosca (Figura 5). Após secar, as lâminas foram fixadas com álcool 70° e coradas com Panótico Rápido® (Diff-Quik), um corante ácido-básico, que possui afinidade pelo citoplasma e núcleo, o qual permite visualização das células e seus contornos. Esse procedimento foi feito semanalmente até que não houvesse mais lesão macroscópica e/ou alterações microscópicas. O método PAAF foi escolhido para evitar sobreposição de células e diminuir a contaminação da lâmina, fatores que quando estão presentes dificultam a caracterização do tumor. Em alguns casos que não foi possível realizar a citologia aspirativa, foi feito swab e/ou “*imprint*”.

Os cães foram considerados portadores de TVT quando apresentaram, à leitura da citologia, células redondas ou ovóides, com núcleo centralizado ou excêntrico contendo nucléolos proeminentes, com ou sem figura de mitose, citoplasma claro, contendo ou não vacúolos (MOSTACHIO et al. 2007; VALENÇOLA, 2015; RIBEIRO; FRIOLANI, 2011). A depender do tipo morfológico predominante foram caracterizados como linfocitoide, plasmocitoide ou misto, quando não havia predomínio de mais de 70% (AMARAL et al., 2012) de nenhum dos dois primeiros tipos. As células que se apresentaram com núcleos centralizados, formato mais arredondado e maior relação núcleo: citoplasma foram consideradas de padrão linfocitoide. Enquanto, as células com morfologia plasmocitoide possuíam citoplasma mais abundante e núcleo excêntrico, além do formato ovoide, como descreveu Amaral et al. (2012). As lâminas confeccionadas foram avaliadas nas objetivas de 40x e 100x através de um microscópio óptico.

Figura 4- Citologia aspirativa com agulha fina de tumor venéreo transmissível em cadela. Apresentação genital do tumor.



Fonte: Acervo do estudo.

Figura 5- Material coletado do tumor e transferido para lâmina de vidro, com extremidade fosca.



Fonte: Acervo do estudo.

### 5.7.2 Histopatologia

Foram colhidos, por biópsia incisional, entre dois a três fragmentos do tumor de cada cão antes do início da quimioterapia, com exceção de um dos cães, em que a biópsia foi feita após o início do tratamento. Esse material foi fixado em formol neutro e tamponado com fosfato a 10% e processado pela técnica rotineira de inclusão em parafina do Laboratório de Patologia Veterinária do HOSPMEV. Concluída a etapa de processamento da amostra, cortes histológicos de 4µm foram corados pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (H.E.) (PROPHET et al., 1992) e analisados em microscópio óptico convencional para posterior classificação do tipo de TVT (plasmocitoide, linfocitoide ou misto). Com base nos diagnósticos obtidos foi determinada a concordância entre a classificação citológica e histológica.

### 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares Graph Pad Prism v.5.0 (Graph Pad Prism Inc., EUA) e STATA 12 (StataCorp LP, USA). O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a homogeneidade das populações caninas nos grupos controle e experimental, com relação a variáveis categóricas como sexo, raça e aspectos tumorais (tamanho do tumor, nódulos, classificação citológica, presença de metástases e localização do tumor). Os testes de Shapiro-Wilk e Skewness / Kurse para normalidade foram utilizados para todas as variáveis quantitativas. Quando apresentavam distribuição normal, as variáveis quantitativas foram analisadas pelo teste T de Student, caso contrário pelo teste de Mann Whitney. A comparação da idade entre os cães controle e experimental foi realizada pelo teste T de Student, enquanto a comparação dos escores clínicos foi realizada pelo teste de Mann Whitney. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar escores clínicos em cães controle e experimentais antes e após o tratamento. Parâmetros do hemograma (hemácias, hemoglobina, hematócrito, CHGM, VGM, plaquetas, proteínas, leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e basófilos) foram comparados antes e após o tratamento em cada grupo, assim como entre os grupos. A duração do tratamento (número de semanas) e as doses necessárias de vincristina necessárias para completar a remissão do tumor entre os dois grupos foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney e teste T de Student, respectivamente. Para todas as análises, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p \leq 0,05$ .

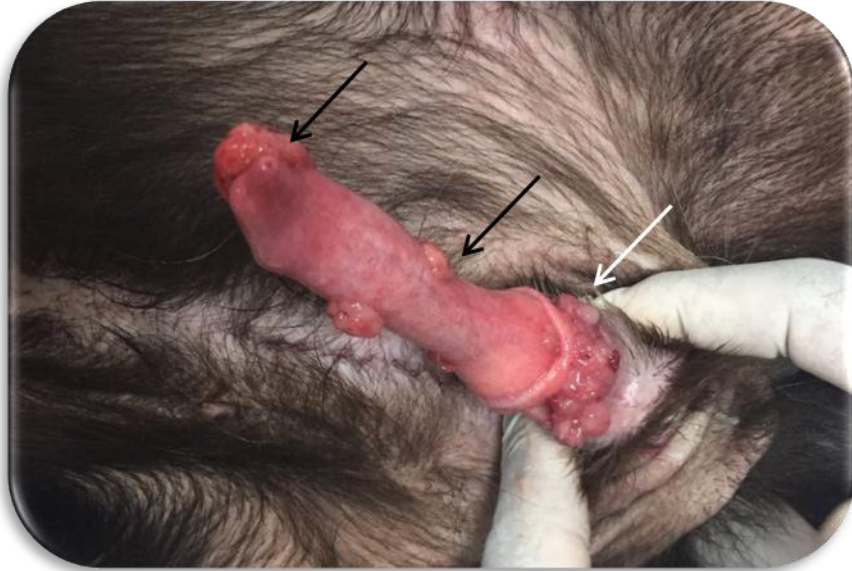
## 6. RESULTADOS

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram atendidos e diagnosticados no Hospital-Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia 41 cães com tumor venéreo transmissível no período de 19 meses (janeiro de 2017 a agosto de 2018). Dentre os cães atendidos, 20 (48,7%) concluíram o tratamento, 18 não concluíram o tratamento e três não iniciaram o tratamento. Dentre esses três, um (2,44%) veio a óbito por uma peritonite, um (2,44%) foi eutanasiado por já ter metástase para sistema nervoso central e outro (2,44%) o tutor optou por não iniciar o tratamento. Dentre esses 20 que concluíram o tratamento, 10 (50%) foram alocados ao G-Vin e 10 (50%) para o G-Iv/Vin.

A Tabela 2 contém dados descritivos dos cães avaliados no presente estudo, como suas características e as características do tumor. É possível observar que não houve diferença estatística entre os grupos com relação ao gênero ( $p= 0,35$ ), raça ( $p= 1,0$ ), idade ( $p= 0,30$ ), tamanho do tumor ( $p= 0,7$ ), a classificação citológica ( $p= 0,7$ ), presença de metástases ( $p= 0,4$ ) e a localização da lesão tumoral ( $p= 0,3$ ). Foi possível notar que a maior parte dos cães era sem raça definida em ambos os grupos (90% e 80%), a média de idade variou entre um e 12 anos com média de  $6.2 \pm 3.3$  no G-Vin e entre um e 11 anos com média de  $4.8 \pm 2.6$  no G-Iv/Vin. Em ambos os grupos a apresentação genital foi a mais comum (Figura 6 e Figura 7), com 90% (9/10) no G-Vin e 60% (6/10) no G-Iv/Vin. Uma tabela com as características de cada cão, individualmente, está presente no Anexo 3.

Figura 6- Apresentação de TVT genital em cão macho, com múltiplos nódulos. Observa-se uma massa tumoral avermelhada na base do pênis de superfície irregular e aspecto de couve-flor (seta branca) e várias outras massas no corpo do pênis (setas pretas) (G-Iv/Vin).



Fonte: Acervo do estudo.

Figura 7- Tumor venéreo transmissível em cadela. Apresentação genital, massa de superfície irregular na vulva, consistência macia (seta preta), avermelhada e com secreção serossanguinolenta (seta branca) (G-Vin).



Fonte: Acervo do estudo.

Foi observado metástase em dois (20%) cães, ambos do G-Iv/Vin. Um deles apresentava tumor genital com metástase para linfonodo inguinal, o outro cão não apresentava lesão macroscópica genital, mas foi observado células tumorais na região através de citologia por “*imprint*” e metástase para baço, fígado, mediastino, peritônio (diagnosticado por citologia aspirativa), além de uma lesão no focinho do lado esquerdo com menos de 3cm de diâmetro.

O cão com tumor extragenital no G-Vin apresentava-se como nódulo cutâneo, na região lateral do pescoço, ulcerado, aderido, não era friável e com secreção serossanguinolenta escassa. Dos tumores extragenitais no G-Iv/Vin, um foi citado acima e possuía metástase, outro possuía uma neoformação na região perianal e o outro animal neoformação na cavidade nasal.



Tabela 2 – Características gerais e aspectos tumorais dos cães do estudo no grupo controle (G-Vin) e no grupo experimental (G-Iv/Vin) atendidos no HOSPMEV-UFBA no período de janeiro de 2017 a agosto de 2018

Variável	Grupo Controle G-Vin (n=10) N (%)	Grupo Experimental G-Iv/Vin (n=10) N (%)	p
<b>Sexo *</b>			
Macho	5 (50)	2 (20)	0.35
Fêmea	5 (50)	8 (80)	
<b>Raça *</b>			
Com raça	1 (10)	2 (20)	1.0
Sem raça definida	9 (90)	8 (80)	
<b>Idade em anos **</b>			
Média de idade	6.2 ± 3.3	4.8 ± 2.6	0.30
<b>Tamanho do tumor *</b>			
< 3cm	2 (20)	0 (0)	0.7
3-5cm	4 (40)	4 (40)	
5-10cm	3 (30)	5 (50)	
<10cm	1 (10)	1 (10)	
<b>Classificação citológica *</b>			
Limfocitoide (L)	3 (30)	1 (10)	0.7
Misto (L & P)	2 (20)	3 (30)	
Plasmocitoide (P)	5 (50)	6 (60)	
<b>Presença de metástases *</b>			
Sim	0 (0)	2 (20)	0.4
Não	10 (100)	8 (80)	
<b>Localização do tumor *</b>			
Genital	9 (90)	6 (60)	0.3
Extragenital	1 (10)	3 (30)	
Genital e extragenital	0 (0)	1 (10)	

(\*) Variável analisada pelo Teste Exato de Fisher

(\*\*) Variável quantitativa analisada pelo Student-teste.

Fonte: Acervo do estudo.

Dos 20 cães avaliados, 14 tinham histórico de livre acesso a rua e a principal queixa dos tutores a respeito dos animais que apresentavam tumor na forma genital foi o aumento de volume da região e secreção serossanguinolenta.

Na Tabela 3 pode-se observar a média e desvio-padrão e também a mediana dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos cães do estudo e pôde-se observar que, de um modo geral, não houve grande variação para acima ou abaixo dos valores de referência. Como não foi possível a colheita de sangue em todos os cães antes de iniciar o tratamento, as avaliações hematológicas foram feitas com base nos 37 cães que possuíam hemograma completo na primeira avaliação. O bioquímico foi avaliado com base nos cães que realizaram a avaliação dos parâmetros de bioquímica sérica no primeiro momento, ou seja, antes de iniciar o tratamento. Como algumas vezes o tutor não possuía condições financeiras para custear a avaliação de todos os parâmetros, houve uma maior variação do “N” no exame bioquímico.

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos e bioquímicos sanguíneos dos 41 cães atendidos no HOSPMEV-UFBA no período de janeiro de 2017 a agosto de 2018

Variável	Média±DP	Mediana	N	Valor de referência
<b>Hemograma (Unidade)</b>				
Hemácia ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	6,14 ±1,10	5,5	37	5,5-1,5
Hemoglobina (g/L)	13,3±2,61	13,50	37	12,0-18,0
Hematócrito (%)	40,76±7,63	41	37	37,0- 55,0
VGM (fl)	66,44±4,08	66,70	37	60,0-77,0
CHGM (g/L)	32,58±1,30	32,50	37	32,0-36,0
Plaquetas (/ $\mu\text{L}$ )	243.850±142.281,61	217.000	37	166.000-575.000
<b>Leucograma</b>				
Leucócitos totais (/mm <sup>3</sup> )	15.875,68±10.266,46	13.600	37	6.000-17.000
Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )	10.943,14±8.485,23	8.840	37	3.000-11.500
Linfócitos (/mm <sup>3</sup> )	2.573,3±1.939,88	1.917	37	1.000-4.800
Monócitos (/mm <sup>3</sup> )	820,73±959,96	460	37	150-1.350
Eosinófilos (/mm <sup>3</sup> )	1.149,7±1.173,18	765	37	100-1.250
<b>Bioquímica sanguínea</b>				
Ureia (mg/dL)	28,5±11,65	24,40	27	21,4 - 59,92
Creatinina (mg/dL)	0,99±0,30	0,90	32	0,5-1,5
FA (U/l)	83,88±50,97	73,50	26	20 - 156
ALT (U/l)	39,47±18,15	36	32	21 - 102
Proteína total (g/dL)	7,69±0,87	7,55	28	5,4 - 7,1
Albumina (g/dL)	2,52±0,46	2,60	29	2,6 - 3,3
Globulina (g/dL)	5,15±1,00	5,15	28	2,7 - 4,4

Fonte: Acervo do estudo.

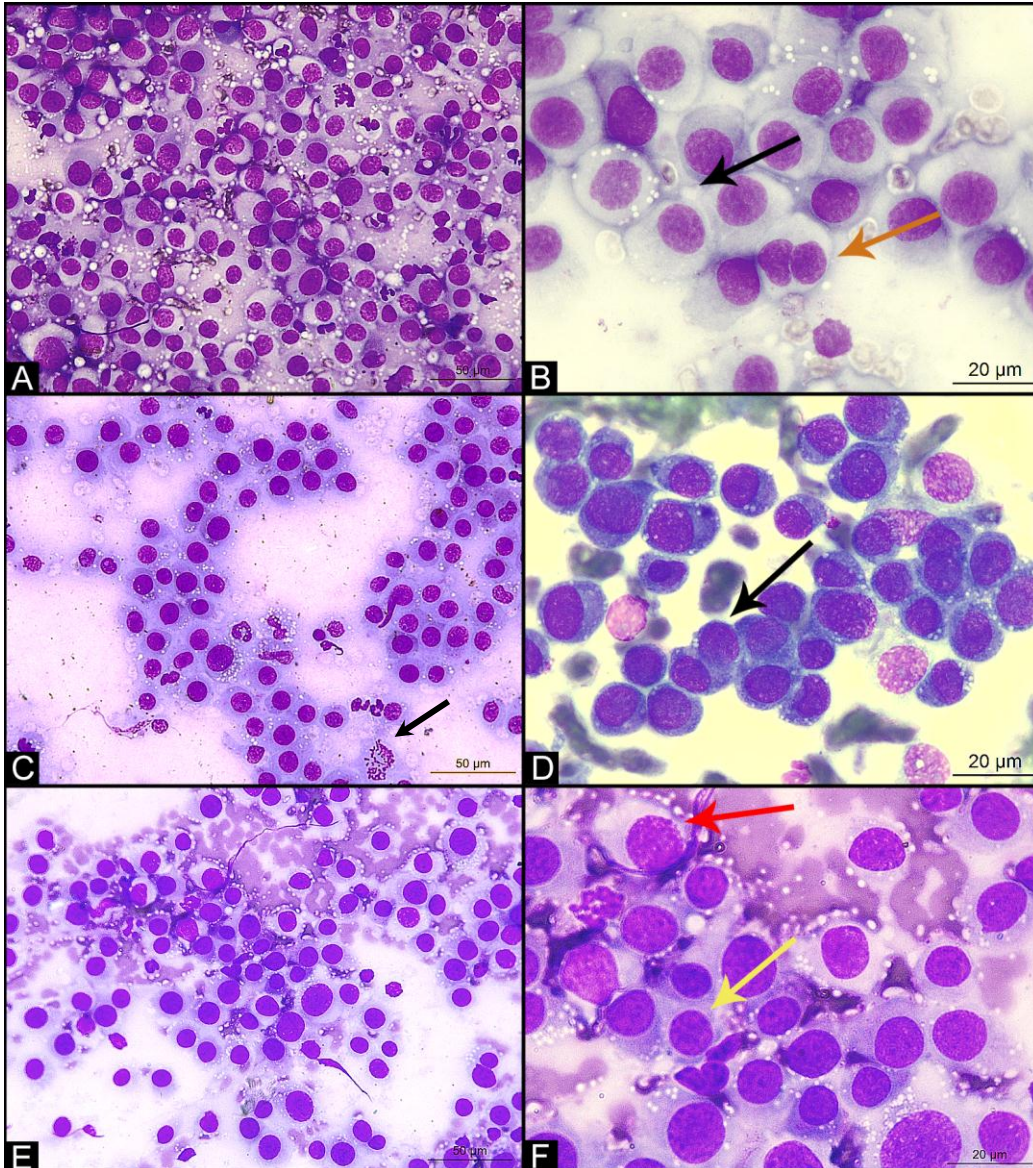
De acordo com o escore, antes do tratamento houve diferença estatística entre os cães dos dois grupos ( $p= 0,0439$ ). Sendo que, cinco cães do G-Vin apresentaram doença leve e cinco apresentaram doença moderada. No G-Iv/Vin dois cães apresentaram doença leve, cinco apresentaram doença moderada, um apresentou doença severa e um apresentou doença terminal. Este cão que apresentou doença terminal já possuía diversas metástases para órgãos abdominais e ainda lesão em focinho, apresentava-se apático, hiporético e desidratado. O outro cão que apresentou doença severa não possuía metástase, mas estava apático, com coloração pálida nas mucosas, miase na lesão tumoral e com bastante secreção necrótica.

Houve diferença significativa nos cães antes e após o tratamento tanto no G-Vin ( $p= 0,0020$ ) e no G-Iv/Vin ( $p= 0,0020$ ). Porém, no G-Vin, após o término do tratamento, dois cães pontuaram cinco no escore, sendo que os outros chegaram à zero. Contudo, no G-Iv/Vin, nove cães chegaram a escore zero e somente um obteve um ponto no escore.

## 6.2 CARACTERIZAÇÃO CITOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DOS TUMORES

Dentre os tipos citomorfológicos de TVT mais prevalentes, o tipo plasmocitoide (21/41) (Figura 8) foi o mais frequente durante o período do estudo, seguindo pelo linfocitoide (8/41) e misto (5/41). A prevalência dos tumores plasmocitoides também pôde ser visto no G-Vin (5/10) e no G-Iv/Vin (6/10). Em sete casos não foi possível classificar os tumores por motivos distintos: pouca celularidade ou nos casos de cadelas que apresentavam tumor genital que não eram exteriorizados, em que não era possível fazer citologia aspirativa, somente swab, e por conta dessa técnica havia maior contaminação nas lâminas e presença de muitas células inflamatórias dificultando a visibilidade das células tumorais. Ainda assim o exame citológico foi conclusivo para todos os casos.

Figura 8- Fotomicrografia de diferentes tipos citomorfológicos do Tumor Venéreo Transmissível canino



**A.** Padrão plasmocitoide (pleomorfismo moderado e predomínio de células com núcleos ovoides) Diff-Quik. 40x. **B.** Padrão plasmocitoide (Citoplasma moderado a abundante (seta preta), núcleos excêntricos com cromatina grosseira e pequena relação núcleo:citoplasma) e presença de célula binucleada (seta laranja) Diff-Quik. 100x. **C.** Padrão linfocitoide (pleomorfismo discreto e predomínio de células com núcleos redondos) e figura de mitose (seta preta) Diff-Quik. 40x. **D.** Padrão linfocitoide (predomínio de núcleos centrais e alta relação núcleo:citoplasma (seta preta)) Diff-Quik. 100x. **E.** Padrão misto (pleomorfismo acentuado e predomínio de células com núcleos redondos a ovoides) Diff-Quik. 40x. **F.** Padrão misto (padrão linfocitoide [seta amarela] e plasmocitoide [seta vermelha]). Fonte: Acervo do estudo.

Nas amostras citológicas foi possível observar células redondas a ovais, com citoplasma claro, escasso, núcleos centrais e excêntricos, com nucléolos grandes e centrais e cromatina grosseira. Mitoses atípicas foram mais frequentes que mitoses típicas. Foram observados na citologia outros critérios de malignidade como anisocitose, anisocariose, núcleo reniforme, amoldamento celular, fagocitose e células binucleadas. A frequência dos critérios de malignidade são descritas na Tabela 4. Nos casos dos tumores em regressão (em

tratamento), as células apresentavam-se degeneradas e associadas a infiltrado inflamatório em variados graus. Nos tumores caracterizados como mistos havia maior pleomorfismo celular quando comparado aos outros dois tipos tumorais. Nos casos em que não havia mais presença de célula tumoral e nem lesão macroscópica, era comum observar células de descamação na citologia. Em alguns casos, não foram observados vacúolos citoplasmáticos nas células tumorais, característica citológica considerada importante para o diagnóstico de TVT. Nesses casos para concluir o diagnóstico foram avaliados os nucléolos grandes e centrais, bem como, as características macroscópicas da lesão.

Tabela 4- Critérios de malignidade encontrados nos diferentes tipos citomorfológicos de tumor venéreo transmissível canino nos cães atendidos no HOSPMEV-UFBA no período de janeiro de 2017 a agosto de 2018

Critério de malignidade	Tipo citomorfológico			Total n= 34
	Plasmocitoide n=21	Linfocitoide n=8	Misto n=5	
<b>Anisocitose</b>	100% (21/21)	62,5% (5/8)	80% (4/5)	88,23% (30/34)
<b>Anisocariose</b>	100% (21/21)	50% (4/8)	60% (3/5)	82,35% (28/34)
<b>Binucleação</b>	14,28% (3/21)	25% (2/8)	40% (2/5)	20,59% (7/34)
<b>Cromatina grosseira</b>	95,23% (20/21)	62,5% (5/8)	60% (3/5)	82,35% (28/34)
<b>Amoldamento celular</b>	0% (0/21)	25% (2/8)	20% (1/5)	8,82% (3/34)
<b>Basofilia citoplasmática</b>	38,09% (8/21)	0% (0/8)	40% (2/5)	29,41% (10/34)
<b>Fagocitose</b>	9,52% (2/21)	12,5% (1/8)	20% (1/5)	11,76% (4/34)
<b>Macrocariose</b>	9,52% (2/21)	0% (0/8)	40% (2/5)	11,76% (4/34)
<b>Macrocitose</b>	28,57% (6/21)	0% (0/8)	0% (0/5)	17,65% (6/34)
<b>Mitoses atípicas</b>	90,48% (19/21)	37,5% (3/8)	40% (2/5)	70,59% (24/34)
<b>Núcleo reniforme</b>	4,76% (1/21)	12,5% (1/8)	20% (1/5)	8,82% (3/34)

Fonte: Acervo do estudo

A avaliação histopatológica foi realizada em 16 dos 41 cães atendidos, sendo observadas células arredondadas a ovais com pleomorfismo moderado, em sua maioria, disposta em forma de manto. O citoplasma era eosinofílico, variando de escasso a abundante e não raras vezes vacuolizados; núcleos ovoides a redondos, contendo nucléolo central e evidente, único ou duplo (Figura 9). Figuras de mitoses foram frequentes e em sua maioria, atípicas. Foram observadas, ainda, áreas focalmente extensas de ulceração, discreta hemorragia multifocal, células em apoptose e discreto infiltrado inflamatório, constituído principalmente por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos, variando de focal a multifocal no discreto estroma fibrovascular.

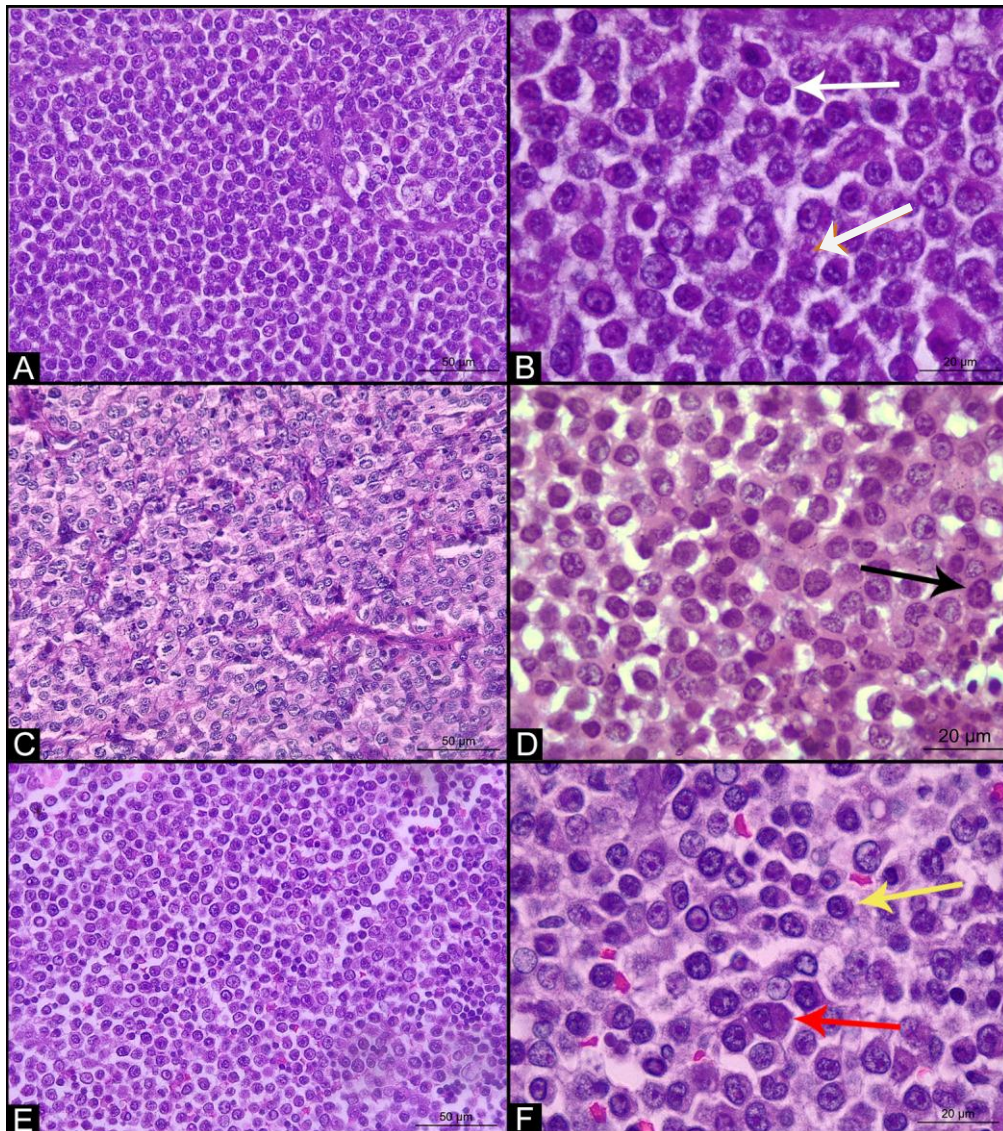
Dos 16 cães que realizaram biópsia para exame histopatológico, 13 (81,25%) obtiveram diagnóstico conclusivo e concordaram com o subtipo especificado na citologia. Um

(6,25%) obteve diagnóstico de TVT em regressão, pois o tutor não autorizou a realização da biópsia antes do tratamento com quimioterápico. Porém, a biópsia foi autorizada após quatro aplicações do quimioterápico, pois o tumor apresentava regressão lenta e a análise citológica não possibilitou concluir sobre a ausência de células tumorais na lesão. A avaliação microscópica da lesão deste cão revelou uma população de células arredondadas a ovais, com aspecto degenerado. O estroma era escasso e raras figuras de mitoses, havia leve infiltrado inflamatório neutrofílico associado a dendritos celulares, células endoteliais ativadas, pigmento ceróide e hemossiderina no citoplasma de alguns macrófagos, achados que caracterizavam estado de regressão tumoral.

Em um dos casos estudados (6,25%), cujo diagnóstico citológico indicou tratar-se de TVT intra-nasal a avaliação histopatológica revelou apenas tecido cutâneo sem sinal de células neoplásicas. Contudo, a ausência de células neoplásica pode ser creditada a dificuldade de aprofundamento na colheita da amostra por conta da região anatômica, sendo avaliado apenas a superfície epitelial do focinho. Em outra situação (6,25%), não foi possível determinar o com segurança o padrão citomorfológico do tumor, diante da ausência de citoplasma e do intenso processo inflamatório associado, fator que sabidamente pode ocasionar displasia celular, mudando a conformação da célula e dificultando sua caracterização. Entretanto, cabe ressaltar que apesar da citologia ser considerada padrão ouro para o diagnóstico definitivo do TVT, o exame histopatológico é importante, pois é capaz de fornecer informações relevantes sobre a arquitetura da neoplasia, bem como sua relação com tecidos adjacentes (infiltração).

Nos tumores em regressão é possível observar células em variados graus de degeneração, infiltrados inflamatórios, além de filamentos de cromatina e células em apoptose.

Figura 9- Fotomicrografias de diferentes tipos morfológicos do Tumor Venéreo Transmissível canino



**A.** Padrão linfocitoide (pleomorfismo discreto e predomínio de células redondas) HE. 40x. **B.** Padrão linfocitoide (citoplasma escasso (seta branca), núcleos predominantemente redondos, com cromatina granulosa, nucléolo único conspicuo e alta relação núcleo: citoplasma) HE. 100x. **C.** Padrão plasmocitoide (pleomorfismo moderado e predomínio de células redondas) HE 40x. **D.** Padrão plasmocitoide (citoplasma moderado (seta preta), núcleos ovais, por vezes, excêntricos, cromatina vesiculada a granulosa, nucléolo único central conspicuo e baixa relação núcleo:citoplasma) HE. 100x. **E.** Padrão misto (pleomorfismo acentuado e predomínio de células redondas) HE. 40x. **F.** Padrão misto (predomínio do padrão linfocitoide (seta amarela) e plasmocitoide (seta vermelha)) HE. 100x. Fonte: Acervo do estudo.

### 6.3 TOXICIDADE TERAPÊUTICA E RESPOSTA AOS PROTOCOLOS

Observando os parâmetros hematológicos dos cães do G-Vin e do G-Iv/Vin, não houve variação estatística para as variáveis: hemácias e hemoglobina em nenhum dos dois grupos. Porém, houve diferença nos valores de plaquetas no G-Vin e G-Iv/Vin quando comparados antes do tratamento ( $p= 0,0468$ ). No G-Vin houve variação significativa nos

valores de leucócitos totais ( $p= 0,0027$ ), neutrófilos ( $p= 0,0371$ ) e monócitos ( $p= 0,0468$ ) nos cães deste grupo comparando antes e após o tratamento, com uma queda relevante na contagem dessas células. Condição que não ocorreu nos cães do G-Iv/Vin. Não houve diferença significativa nos valores de linfócitos e eosinófilos em nenhum dos dois grupos antes e após o tratamento. Também foi observado que a contagem de leucócitos totais está aumentada em dois cães do G-Vin e em dois cães do G-Iv/Vin antes de iniciar o tratamento.

Ao observar a quantidade de aplicações de vincristina necessárias até a remissão do tumor, nota-se que no G-Iv/Vin, três cães apresentaram regressão completa do tumor após apenas três aplicações de vincristina (Tabela 5) um cão apresentou cura completa após apenas duas sessões de quimioterapia, dois cães necessitaram de quatro sessões e em quatro cães foram feitas cinco ou mais aplicações do quimioterápico, até a cura do tumor. Nos cães G-Vin dois necessitaram de mais de quatro aplicações de vincristina até total remissão do tumor, cinco necessitaram de quatro sessões e três cães apresentaram cura com menos de quatro aplicações, sendo que desses três, um cão apresentou regressão total do tumor com aplicação.

No G-Vin um animal que apresentou lesão maior que 10 cm necessitou de pelo menos sete aplicações até a remissão completa do tumor, já o outro cão que necessitou de sete aplicações, também no G-Vin, tinha uma lesão tumoral de 3-5cm e os dois tumores eram do tipo plasmocitoide.

O tempo de tratamento em número de semana no G-Vin (vincristina) variou entre três e 13 semanas e no G-Iv/Vin entre duas e oito semanas. Mas, observando a Tabela 5, não houve diferença estatística entre o tempo global de tratamento entre cães dos dois grupos.

Tabela 5 - Número de aplicações de vincristina até a regressão completa do tumor nos cães do G-Vin e do G-Iv/Vin atendidos no HOSPMEV-UFBA, no período de janeiro de 2017 a agosto de 2018

<b>Nº de aplicações até a completa regressão do tumor</b>	<b>Nº de cães G-Vin N (%)</b>	<b>Nº de cães G-Iv/Vin N (%)</b>
Uma	1 (10%)	0 (0%)
Duas	0 (0%)	1 (1%)
Três	2 (20%)	3 (30%)
Quatro	5 (50%)	2 (20%)
Cinco	0 (0%)	2 (20%)
Seis	0 (0%)	1 (10%)
Sete	2 (20%)	0 (0%)
Oito	0 (0%)	1 (10%)

Fonte: Acervo do estudo.



No paciente canino do G-Iv/Vin que apresentava metástase para linfonodo, o tumor regrediu completamente após quatro aplicações de vincristina associado à ivermectina. No outro animal que apresentava metástase, foram realizadas oito sessões de quimioterapia também com associação da ivermectina. Neste cão, após quatro sessões o animal não apresentava mais nódulos no fígado, baço, mediastino e focinho, mas ainda apresentava nódulos com dimensões entre 0,62 x 0,18cm na região do peritônio, que não regrediram mais de tamanho após a sétima aplicação do quimioterápico. Optou-se por manter os exames de imagem a cada oito dias e posteriormente a cada 15 dias, durante o período de dois meses, para avaliar se seria apenas tecido cicatricial ou se haveria um novo crescimento. Após um mês de acompanhamento os nódulos tinham praticamente desaparecido. Esses dois cães apresentam TVT de morfologia mista.

As evidências de resposta tumoral ao quimioterápico no presente estudo mostram que em todos os cães tratados houve redução do tumor (Figura 10). E ao comparar a média de aplicações entre os grupos (Tabela 6), apesar do G-Vin apresentar média menor do que o G-Iv/Vin, não houve diferença estatística entre os grupos ( $p=0,80$ ).

Tabela 6– Detalhes do protocolo de tratamento em cães do grupo tratado somente com vincristina (G-Vin) do grupo tratado com vincristina associado a ivermectina (G-Iv/Vin) atendidos no HOSPMEV-UFBA, no período de janeiro de 2017 a agosto de 2018

Detalhes	Grupo vincristina G-Vin (n=10)	Grupo vincristina+ivermectina G-Iv/Vin (n=10)	<i>p</i>
Nº doses de vincristina até remissão total do tumor (Média ± DP)*	4.1± 1.8	4.3± 1.8	0.80
Número de semanas necessária para completar o tratamento (Mediana± IQR)**	4 ± 1	4 ± 2	0.48

(\*) Teste T- Student

(\*\*) Teste de Mann-Whitney

Fonte: Acervo do estudo.

Em um cão do G-Vin (Figura 11), o tumor regrediu totalmente após uma única aplicação de vincristina; o tempo até o desaparecimento da lesão foi de um mês. Esse cão teve seu tratamento interrompido após a primeira aplicação, pois apresentou leucopenia (1.300 $\mu$ L; Valores normais= 6.000-17.000 $\mu$ L) por linfopenia (104 $\mu$ L; Valores normais= 1.000-4.800 $\mu$ L) e neutropenia (676 $\mu$ L; Valores normais= 3.000-11.500 $\mu$ L). Durante um mês de acompanhamento, sem novas aplicações do quimioterápico houve a regressão total da lesão.

Figura 10- Apresentação de TVT genital em cadela do G-Iv/Vin antes de iniciar o tratamento ( $A_T$ ) e após o término do tratamento ( $D_T$ )



**A.** Apresentação de TVT genital em fêmea antes da primeira aplicação de vincristina e ivermectina. **B.** Paciente canino após receber quatro aplicações de vincristina no protocolo de associação com a ivermectina, em um intervalo de quatro semanas. Fonte: Acervo do estudo.

Figura 11- Apresentação de TVT extragenital (cutâneo) em cão macho do G-Vin antes de iniciar ( $A_T$ ) o tratamento e após o término do tratamento ( $D_T$ )



**A.** Nódulo na região lateral do pescoço, de consistência macia e secreção serossanguinolenta escassa antes de iniciar o protocolo quimioterápico ( $A_T$ ). **B.** Paciente após receber uma aplicação de vincristina ( $D_T$ ) e regressão total do tumor. Fonte: Acervo do estudo.

Ao comparar o tipo plasmocitoide dos dois grupos estudados, analisando o tempo de tratamento (Tabela 7) e número de aplicações de vincristina nos cães com esse tipo de tumor, não foi observado diferença significativa em nenhuma das duas variáveis citadas acima.

Tabela 7- Diferença entre tempo de tratamento e número de aplicações de vincristina em cães do grupo tratado somente com vincristina (G-Vin) do grupo tratado com vincristina associado à ivermectina (G-Iv/Vin) com tumores do tipo plasmocitoide, atendidos no HOSPMEV-UFBA, no período de janeiro de 2017 a agosto de 2018

Variáveis	Grupo vincristina G-Vin (n= 5)	Grupo ivermectina+vincristina G-Iv/Vin (n= 6)	<i>p</i>
Nº de aplicações de vincristina (Média±Desvio-padrão) *	4,4±2,60	4,16±1,47	0,855
Tempo de tratamento em semanas (Mediana±IIQ) **	4±4	4.5±2	0,399

(\*) Teste T de Student

(\*\*) Teste Mann-Whitney

IIQ: Intervalo Interquartil

Fonte: Acervo do estudo

De todos os cães avaliados, somente dois apresentaram alterações gastrointestinais. Um deles apresentou emagrecimento e apatia logo após a primeira sessão de quimioterapia (este animal já se encontrava debilitado e tinha metástases, mas após a segunda sessão do quimioterápico já respondia bem ao tratamento) e pertencia ao G-Iv/Vin e o outro ao G-Vin. Nesses pacientes houve episódios de vômitos entre um e três dias após a aplicação da vincristina, mas que não apresentaram maiores complicações. Os pacientes foram tratados com fármacos antieméticos, e esse sinal clínico desapareceu no terceiro dia após a quimioterapia.

## 7. DISCUSSÃO

Ao longo dos anos têm-se demonstrado a ivermectina como uma das opções de medicações que podem ser associadas à vincristina para o tratamento de TVT, para diminuir os casos de resistência ao quimioterápico, assim como, o tempo de tratamento e número de doses de vincristina, visando diminuir seus efeitos colaterais. Porém não se sabia ao certo quais os possíveis efeitos colaterais desta associação.

Nos dois grupos houve uma porcentagem maior de cães sem raça definida, dados que corroboram aqueles encontrados por Brandão et al. (2002), e a maioria dos cães encontravam-se em idade reprodutiva como descrito em outros estudos (SILVA et al 2007a; PEIXOTO, et al., 2016). A maior parte dos cães atendidos eram semi-domiciliados e alguns cães errantes - adotados já com a doença - o que aumenta as formas de contrair o tumor. Esses dados estão de acordo com aqueles encontrados por Peixoto et al. (2016) que relataram que mesmo a maior parte dos cães com TVT do seu estudo serem domiciliados, se frequentassem a rua sozinhos, isso era um fator que os tornava mais expostos à contaminação.

Somente um cão apresentou TVT primário cutâneo, uma forma de TVT extragenital, como já foi relatado por Ramadinha et al. (2016) e Silva et al. (2007b), porém, foi observado que os tumores na região genital possuíam aspecto friável (MOSTACHIO et al., 2007; HUPPES et al., 2014) e secreção serossanguinolenta (SOUZA; MENDONÇA, 2009; FERNANDES et a., 2013), enquanto que o tumor cutâneo não tinha as características macroscópicas típicas do TVT. De acordo com Ostrander et al. (2016), a principal forma de transmissão é pelo contato sexual, porém Sousa et al. (2000) relataram que também pode ocorrer pelo contato com outra região contaminada. Contudo, a apresentação genital do tumor ainda é a mais comum (ECHER et al., 2015). Aumento de volume na região genital, com secreção serossanguinolenta eram as principais queixas dos tutores, como foi descrito por Mostachio et al. (2007), Fernandes et al. (2013) e Oliveira et al. (2017). Segundo Brandão et al. (2002), a apresentação nasal do tumor é a segunda manifestação mais comum do TVT, e foram encontrados dois casos nesse estudo, porém um animal não concluiu o tratamento.

A maioria dos cães apresentava a forma plasmocitoide do tumor, ratificando os achados de Amaral et al. em (2004), nos quais dos 576 cães com TVT, 74% eram do tipo plasmocitoide. Estudos feitos por Oliveira et al. (2017) também demonstraram maior incidência dos tumores plasmocitoides, seguido do tipo misto e linfocitoide, respectivamente, porém no presente estudo o tipo linfocitoide foi mais frequente que o tipo misto. Fêo et al.

(2018), demonstraram que dos 17 cães do seu estudo, todos possuíam TVT com padrão plasmocitoide.

A citologia foi conclusiva em 100% dos casos estudados. Brandão et al. (2002) mencionaram uma porcentagem de 94,6% de eficiência na citologia para o diagnóstico de TVT. Os critérios de malignidade encontrados neste estudo foram semelhantes aos encontrados por Valençola et al. (2015). E houve uma maior porcentagem de critérios de malignidade em tumores do tipo plasmocitoide do que aqueles de padrão misto e linfocitoide. Apesar dos vacúolos citoplasmáticos, considerado uma das principais características microscópicas do tumor (SANTOS et al., 2001), eventualmente, não terem sido visualizados em algumas amostras citológicas. O exame histopatológico demonstrou-se importante porque possibilita a melhor caracterização dos tipos celulares, principalmente quando existe dúvidas na avaliação citológica (MAGALHÃES et al. 2001). Nos tumores em regressão foi possível observar infiltrado inflamatório e células em variados graus de degeneração, células em apoptose, além do número de células tumorais, que diminuí consideravelmente, assim como descreveram Vural et al. (2018).

A mielossupressão é uma das consequências do tratamento quimioterápico (SOUSA et al., 2000). A diminuição no número de leucócitos pode ser causada por dois fatores: invasão medular do tumor ou efeito imunossupressor do quimioterápico (FERREIRA, 2016), neste estudo acredita-se ter sido causado pelo segundo fator, visto que os pacientes do G-Vin não apresentavam formas mais graves da doença. Segundo Furini et al. (2014) os quimioterápicos agem em células que estão em intensa mitose, como as células tumorais, porém, por esse fator agem também em células normais, trazendo como consequência do seu uso, efeitos adversos.

Sousa et al. (2000) e Ferreira (2016) não observaram alterações hematológicas em cães tratados para TVT utilizando vincristina. Outros estudos demonstraram diminuição significativa na fração leucocitária com uso do sulfato de vincristina (CAMACHO; LAUS, 1987; FARO et al., 2008). Hantrakul et al. (2014) em um estudo feito com seis cães, observaram leucopenia, neutropenia e trombocitopenia em dois cães tratados somente com vincristina e anemia em um cão. No presente estudo houve variação na contagem de leucócitos, monócitos e neutrófilos somente nos cães do G-Vin e não houve queda na contagem de plaquetas em nenhum dos dois grupos. De acordo com Furini et al. (2014) a toxicidade na medula óssea por conta do uso de vincristina pode levar à um quadro de neutropenia, sendo que esta seria a primeira alteração a ser encontrada, por conta do tempo de meia-vida das células. Perez et al. (2005) em estudo feitos em ratos, utilizando sulfato de vincristina na dose de 4mg/m<sup>2</sup> demonstrou que houve efeito citotóxico nos animais, com

diminuição moderada dos valores da fração leucocitária, o que foi observado neste estudo somente nos cães do G-Vin e em uma dose oito vezes menor de vincristina.

O número aumentado da contagem de leucócitos antes das aplicações de vincristina pode ser fruto de infecções secundárias. Ferreira (2016) relatou aumento no número de bastonetes antes das aplicações do quimioterápico e relacionou isso ao processo inflamatório causado pela neoplasia.

A glicoproteína-P é uma proteína transmembrana que está presente também na barreira hematoencefálica e em células intestinais promovendo eliminação de fármacos do sistema nervoso central e trato intestinal e inibindo sua absorção (LINARDI; NATALINI, 2006). A associação entre dois fármacos que funcionam como substrato da glicoproteína-P podem levar a neutropenia (mielossupressão) e distúrbios metabólicos graves além de alterações gastrointestinais devido a maior exposição ao quimioterápico (MEALEY; FIDEL, 2015). Sabe-se que a ivermectina e a vincristina são drogas que funcionam como substrato da glicoproteína-P (MEALEY; FIDEL, 2015), entretanto no presente estudo não foram observados efeitos colaterais significativos dessa associação, principalmente com relação aos biomarcadores hematológicos utilizados para aferir a toxicidade terapêutica, comprovando a eficiência do tratamento sem os efeitos colaterais indesejados.

Em contrapartida, Hantrakul et al. (2014) em estudos com farmacocinética indica que a vincristina é distribuída aos tecidos periféricos de cães com TVT e que o fármaco é atraído por tecidos rico em tubulinas, como é o caso do tecido tumoral de TVT. Talvez por isso a interação entre vincristina-ivermectina não tenha causado toxicidade nos pacientes. Outros estudos relatam o uso da doxorrubicina para cães com quimioresistência ao tratamento com vincristina (HUPPES et al., 2014; FERNANDES et al., 2013), porém entre os efeitos colaterais, está a cardiotoxicidade dessa droga (VIÉRA, 2015), justificando o porquê de não ser a primeira escolha para o tratamento dessa neoplasia. Já foi relatado também uso da radioterapia em alguns cães com TVT, porém, esta terapêutica está limitada já que, segundo Ciarlini et al. (2014) não pode ser empregada em pacientes com suspeita de metástase.

Não houve diferença estatística em cães tratados com vincristina como única droga e naqueles tratados com vincristina associada à ivermectina. Entretanto, também não houve malefícios nesta associação. Alguns estudos realizados em camundongos demonstram que a ivermectina, quando aplicadas em doses terapêuticas, pode funcionar tanto como um fármaco antiparasitário assim como anticancerígeno seguro (KHALIL; SAMRAH, 2018). Não houve efeitos colaterais da associação vincristina-ivermectina no presente estudo. Com isso a associação traz benefícios no tratamento do TVT e além dos benefícios para tratamento de

endoparasitos (CANGA et al., 2009). Juarez et al. (2018) relataram alguns mecanismos de ação antitumoral da ivermectina, em doses variadas, em estudos *in vitro* e *in vivo* não só relacionado à inibição de glicoproteína-P, como também, indutor de disfunção mitocondrial e dano oxidativo levando à morte celular e também como indutor de autofagia gerando um bloqueio dos repressores de autofagia Akt/mTOR, age também como inibidor da helicase, que são proteínas responsáveis por diversos aspectos no processamento do RNA, atua também nas vias WNT-TCF causando sua inibição, ativa os receptores P2X7/P2X7, inibe a proteína PAK1, aumenta a atividade dos canais de cloreto, inibe o domínio SIN3, e desregula os marcadores Nanog, Sox2, Oct4 gene. Isso faz pensar que talvez o efeito antitumoral da ivermectina associada à vincristina não tenha gerado diferenças significativas com relação ao protocolo, devido ao número de cães utilizados no estudo. Entretanto, ainda assim, o quimioterápico ocasionou menos efeitos colaterais nos cães do G-Iv/Vin do que nos cães do G-Vin, o que é um fator positivo, já que a redução desses efeitos é um dos objetivos desta associação, levando a redução do tempo global de tratamento.

A diferença observada nos cães dos dois grupos antes de iniciar o tratamento pode justificar o fato de não haver diferença estatística entre os dois protocolos de tratamento, já que, os cães do G-Iv/Vin apresentavam doença mais grave do que os cães do G-Vin. Além disso, nos dois protocolos terapêuticos houve redução total do tumor, entretanto dois cães do G-Vin apresentaram escore cinco após o término do tratamento e no G-Iv/Vin, apenas um animal não reduziu seu escore a zero, com pontuação um no escore final. Lapa (2009) demonstrou através de análises citológicas e histopatológicas que existe cura mais rápida doTVT quando a vincristina é usada associada à ivermectina do que quando usada como único fármaco. Lopes et al. (2016) relataram que a associação da vincristina no tratamento de um animal com tumor venéreo transmissível foi satisfatória. Estudos relatam outras associações, como a ciclofosfamida com a vincristina, com efeitos satisfatórios para regressão tumoral, porém alguns efeitos adversos foram observados, como, hemoglobina na urina, que segundo os autores foram causados pelo uso da ciclofosfamida (CANAL et al., 2005). Pode-se observar no presente estudo que os efeitos colaterais causados pela associação da vincristina e ivermectina foram muito discretos e houve resposta terapêutica completa dos cães tratados. O que não foi observado nos cães tratados com outras drogas, como o metotrexato e a ciclofosfamida (AMBER et al., 1990).

Nota-se uma maior quantidade de tumores extragenitais em cães do G-Iv/Vin do que do G-Vin. Sabidamente tumores extragenitais tendem a responder mais lentamente ao

tratamento com protocolo quimioterápico (FILGUEIRA, 2010). Talvez este também tenha sido um fator de influência no tratamento de tumores no G-Iv/Vin.

Não houve diferença significativa no tempo de tratamento e número de aplicações de vincristina nos cães com tumores plasmocitoides comparando os dois grupos. Sabe-se que tumores do tipo plasmocitoide têm uma maior expressão de glicoproteína-P (GASPAR, 2005) e tendem a ter uma resposta mais lenta ou apresentarem mais casos de resistência quando comparado aos outros dois tipos (FLÓREZ et al., 2014). Possivelmente o número reduzido de animais com o tumor do tipo plasmocitoide não tenha sido suficiente para causar uma diferença expressiva nos dois protocolos de tratamento.

Os efeitos gastrointestinais nos cães do estudo foram considerados discretos e ocorreram em somente dois cães. Distúrbios digestivos foram também descritos por Ramadinha et al. (2016), que demonstraram também outros efeitos colaterais, incluindo distúrbios hematológicos, diarreia, vômito, emagrecimento e inapetência, presentes somente em 15,53% de um total de 65 cães tratados com vincristina.



## 8. CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que existe benefício em associar as duas drogas para o tratamento de TVT, porém, sugere-se estudos com maior número de amostras para avaliar diferença estatística entre os grupos.

Com o presente estudo é possível inferir que o grau de citotoxicidade foi observado nos cães que foram tratados para tumor venéreo transmissível com o protocolo convencional da vincristina e não foram observados naqueles tratados com a associação de ivermectina aplicada entre 24 a 48 horas, pela via SC antes da quimioterapia.

Apesar do TVT ser considerado um tumor maligno o índice de metástase foi baixo (apenas dois animais) e a apresentação genital do tumor ainda é a mais observada.

No exame citológico e histopatológico, pôde-se observar a concordância entre as duas técnicas. Sendo o tipo plasmocitoide o mais frequente. Contudo, apesar de ter sido o subtipo mais frequente e considerado mais agressivo, não houve relato de resistência à vincristina nos cães tratados nos G-Vin e no G-Iv/Vin.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEÑA, M. C.; VILLEGAS, A. Tumor venéreo transmissível disseminado em uma perra. **Clínica veterinária de pequenos animais**. v. 27, n. 4, p. 305, 2007.
- AFONSO, E. C. A.; MORAES, D. PAULA, T. M.; MALUCELLI-NETO, L. R.; HONSHO, D. K.; PAURA, D.; FERREIRA, W. L.; CASTRO, M. B. Metástase de tumor venéreo transmissível (TVT). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 41, p. 109-110, 2004.
- AGNEW, D. W.; MACLACHLAN, N. J. Tumors of the genital systems. In: MEUTEN, D. J. Tumors in Domestic Animals. 5 ed. John Wiley & Sons, Inc. 2017. P. 718-721.
- AJELLO, P.; GIMBO A. Presenza di particelle virali nelle cellule del tumore di Sticker. **Atti Soc Ital Sci Nat**. v. 19, p. 736-739, 1965.
- AMARAL, A. S.; GASPAR, L. F. J.; SILVA, S. B.; ROCHA, N. S. Diagnóstico citológico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu, Brasil (estudo descritivo: 1994-2003). **Revista Portuguesa de Ciências veterinárias**. v. 99, n. 551, p.167-171, 2004.
- AMARAL, A. V. C.; OLIVEIRA, R. F.; SILVA, A. P. S. M.; BAYLÃO, M. L.; LUZ, L. C.; SANT'ANA, F. J. F. Tumor venéreo transmissível intraocular em cão – relato de caso. **Veterinária e Zootecnia**. v. 19, n. 1, p. 79-85, 2012.
- AMBER, E. I.; HENDERSON, R. A. Canine transmissible venereal tumor: evaluation of surgical excision of primary and metastatic lesions in Zaria-Nigeria. **Journal American Animal Hospital Association**, v. 18, p. 350-352, 1982.
- AMBER, E. I.; HENDERSON, R. A.; ADEYANJU, J. B.; GYANG, E. O. Single-drug chemotherapy of canine transmissible venereal tumor with cyclophosphamide, methotrexate, or vincristine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 4, n. 3, p. 144-147, 1990.
- ANDRADE, L. F. S.; OLIVEIRA D. M.; DANTAS, A. F. M.; SOUZA, A. P.; NETO, P. I. N.; RIET-CORREA, F. Tumores de cães e gatos diagnosticados no semiárido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, n. 10, p. 1037-1040, 2012.
- APTEKMANN, K. P.; COSTA, M. T.; FABENI, R. C.; MACHADO, R. Z.; SANTANA, A. E. Avaliação comparativa da hemopoiese e do perfil seroproteico de cães portadores de tumor venéreo transmissível de ocorrência natural e induzido através de transplantes alogênicos. **Veterinária Notícias**. v. 11, n. 1, p. 25-34, 2005.
- AZEREDO, F.; UCHÔA, F. T.; COSTA, T. D. Papel da glicoproteína-P na farmacocinética e nas interações medicamentosas. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 90, n. 6, p. 321-326, 2009.
- BASSANI-SILVA, S.; SFORCIN, J. M.; AMARAL, A. S.; GASPAR, L. F. J.; ROCHA, N. S.; Propolis effect *in vitro* on canine transmissible venereal tumor cells. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 102, n. 563/564, p. 261-265, 2007.
- BATISTA, J. S.; SOARES, H. S.; PEREIRA, R. H. M. A.; PETRI, A. A.; SOUSA, F. D. N.;

NUNES, F. C. R. Tumor venéreo transmissível canino com localização intra-ocular e metástase no baço. **Acta Veterinária Brasília**. v. 1, n. 1, p. 45-48, 2007.

BATTISTACCI, M.; MORRICONI, F. Ricerche ultrastrutturali sul sarcoma di Sticker. **Nuova Vet.** v. 50, p. 226–236, 1974.

BELLEI, M. H. M.; NEVES, D. S.; GAVA, A.; LIZ, P. P.; PILATI, C. Prevalência de neoplasias cutâneas diagnosticadas em caninos no estado de Santa Catarina, Brasil, no período entre 1998 a 2002. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. v. 5, n. 1, p. 73-79, 2006.

BEZERRA, D. P. **A glicoproteína-P e o gene MDR1**. Monografia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2011.

BLOOM, F.; PAFF, G. H.; NOBACK, C. R. The transmissible venereal tumor of a dog- Studies indicating that the tumor cells are mature end cells of reticulo-endothelial origin. **The American Journal of Pathology**. v. 27, n. 1, p. 129-139, 1951

BRANDÃO, C. V. S.; BORGES, A. G.; RANZANI, J. J. T.; RAHAL, S. C.; TEIXEIRA, C. R.; ROCHA, N. S. Tumor venéreo transmissível: estudo retrospectivo de 127 casos (1998-2000). **Revista de Educação Continuada CRMV-SP**. v. 5, n. 1, p. 25-31, 2002.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**. V.33, n.6, p. 1359-1369, 2010.

BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders de clínica de pequenos animais**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2008. 2048 p.

BOSCO, A. M.; BRANCALIONE, T.; ZILLOTTO L. Tumor venéreo transmissível em cadela – relato de caso. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19 2010. Guarapuava. **Anais...** Guarapuava: UNICENTRO, 2010.

BOSCOS, C. M.; VERVERIDES, H. N. Canine TVT- Clinical findings, diagnosis and treatment. In: World congress of the world small animal veterinary association, 29, 2004, Grecia. **Proceedings...** Rohdes: Wsava, 2004.

BRITO, C. P.; OLIVEIRA, C. M.; SOARES, F. A.; FAUSTINO, M.; OLIVEIRA, C. A. Immunohistochemical determination of estrogen receptor- $\alpha$  in vaginal and tumor tissues of health and TVT- affected bitches and their relation to serum concentrations of estradiol-17 $\beta$  and progesterone. **Theriogenology**. v. 66, n. 6-7, p. 1587-1592, 2006.

BUENO, M. G.; BRITO, C. P.; HAIPEK, K.; OLIVEIRA, C. M. Análise retrospectiva do tumor venéreo transmissível (TVT) em cadelas, durante os anos de 1996 a 2002, avaliação da resposta ao tratamento quimioterápico. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 40, 2003.

CAMACHO, A. A.; LAUS, J. L. Estudo sobre a eficiência da vincristina no tratamento de cães com tumor venéreo transmissível. **Ars Veterinária**, v. 3, n. 1, p. 37-42, 1987.

CANAL, I. H.; DAGLI, M.L. Z.; TORRES, L. N.; PIVETA, L. C.; CANAL, R. B. TVT NASAL -Tumor Venéreo Transmissível- um caso clínico. **REDVET Revista Electrónica de**

**Veterinaria [online]**. v. 6, n. 2, 2005.

CANGA, A. G.; PRIETO, A. M. S.; LIÉBANA, M. J. D.; MARTÍNEZ, N. F.; VEGA, M. S.; VIEITEZ, J. J. G. . The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 25-37, 2009.

CARVALHO, C. M. **Tumor venéreo transmissível canino com enfoque nos diversos tratamentos**. Monografia. Universidade estadual “Júlio Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo, 2010.

CARVALHO, T. P. A.; CASCARDI, A. F.; MUROLO, F. P. D’OLIVEIRA, K. S. Metástase ocular de tumor venéreo transmissível em cão- relato de caso. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 40, n. supl., p. 219, 2004.

CASTELO-BRANCO, P. S. M.; SOUZA, S. A. L.; LOPES, F. P. P. L.; CASTRO, V.; SENA, P.; PEREIRA, J. B.; FONSECA, L. M. B.; GUTFILEN, B. Uso da 99m Tc-Timina na identificação de metástases de tumor venéreo transmissível canino com apresentação cutânea. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 8, p. 367-370, 2008.

CATONE, G.; MARINO, G.; POGLAYEN, G.; GRAMICCIA, M.; LUDOVISI, A.; ZANGHI, A. Canine transmissible venereal tumour parasitized by *Leishmania infantum*. **Veterinary Research Communications**. v. 27, n. 7, p. 549-553, 2003.

CENDOROGLO, M.; HAMERSHLAK, N.; RIBEIRO, A. A. F.; GUENDELMANN, R. A. K.; SANTOS, V. A. **Guia de protocolos e medicamentos para tratamento em oncologia e hematologia**. São Paulo, Hospital Albert Einstein, 2013. 516p.

CIARLINI, L. D. R. P.; KOIVISTO, M. B.; FERNANDES, M. A. R.; SOREANO, M.; SILVA, R. B.; SILVA, A. R. S. Uso da radioterapia no tumor venéreo transmissível em cães. **Veterinária e Zootecnia**. v. 21, n. 2, p. 279-287, 2014.

CRUZ, G. D.; SANTOS, C. F.; SANTOS, C. R.; RUSCHI, C. S.; ELIAS, T.; XAVIER, J. G.; BONAMIN, L. V. Metástase visceral de tumor venéreo transmissível em cão. **Veterinária e Zootecnia**. v. 16, n. 3, p. 465-470, 2009.

DABUS, D. M. M.; TENTRIN, T. C.; BOCARDO, M.; LIMA, G. S.; LOT, R. F. E; BARIANI, M. H.; ROCHA, N. S. Estudo epidemiológico do tumor venéreo transmissível baseado nos padrões plasmocitoide e linfocitoide em cães atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. ano VI, n. 11, 2008.

DALECK, C. R.; SILVA, M. C. V.; DE NARDI, A. B.; ZANATTA, R.; BRUM, A. M. Estudo epidemiológico, radiográfico e terapêutico de cães acometidos por tumor venéreo transmissível (TVT) nasal em um período de 12 meses. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 41, 2004.

DAS, U.; DAS, A. K. Review of canine transmissible venereal sarcoma. **Veterinary Research Communications**. v. 24, n. 8, p. 545-556, 2000.

DRUMOND, K. O.; QUESSADA, A. M.; SILVA, S. M. S.; COSTA, F. A. L.; SILVA, L. S.; PINHO, F. A.; LOPES, R. R. F. B. Transmissible venereal tumor treated with autohemotherapy. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 41, n. 1, p. 1107, 2013.

DRUMOND, K. O.; QUESSADA A. M.; SILVA, S. M. M. S. Regressão espontânea de tumor venéreo transmissível canino – relato de caso. **PUBVET**. v. 2, n. 38, 2008.

DUARTE, R.; NIERO, R.; DORETTO, J. S.; MANZAN, R. M.; KOGIKA, M. M. Eritrocitose associada a tumor venéreo transmissível em cão: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n. 6, p. 1018-1023, 2006.

ECHER, G.; BECK, C.; FRAGA, D. R.; KRUGER, R. M.; Tumor venéreo transmissível em um canino sem raça definida. In: SALÃO DO CONHECIMENTO UNIJUÍ, Jornada de Pesquisa, 20., 2015, Ijuí, 2015. **Anais...**, Ijuí: UNIJUÍ. 2015, v. 1, n. 1.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do cão e do gato**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 1038p.

FARO, A. M., DALECK, C. R., SANTANA, A. E., NARDI, A. B., MOTTA, F. R., & EURIDES, D. Avaliação hematológica em cães submetidos ao tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina, prednisona e ciclofosfamida. Estudo experimental. **Ars Veterinaria**, v. 24, n. 1, p. 01-08, 2009.

FÊO, H. B.; FLÓREZ, L. M.; YAMATOGLI, R. S.; DUZANSKI, A. P.; ARAÚJO JR, J. P.; OLIVEIRA, R. A.; ROCHA, N. S. Does the tumor microenvironment alter tumorigenesis and clinical response in transmissible venereal tumour in dogs? **Veterinary and Comparative Oncology**. v. 16, n. 3, p. 1-9, 2018.

FERNANDES, C. P. M.; GASPAR, L. F. J.; MEINERZ, A. R. M.; GRECCO, F. B.; NOBRE, M. O.; CLEFF, M. B. Tumor venéreo transmissível canino com metástase encefálica. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 34, n. 6, p. 3929-3934, 2013.

FERNANDES, M. A. R.; ANDRADE, A. L.; LUVIZOTO, M. C. R.; PIERÔ, J. R.; CIARLINI, L. D. R. P. Radioterapia em Medicina Veterinária: princípios e perspectivas. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 4, n. 2, 2010.

FERREIRA, M. A. Q. B. **Avaliação clínica, hematológica, bioquímica e citopatológica de cães portadores do tumor venéreo transmissível (TVT) tratados com sulfato de vincristina**. Dissertação. Ciência Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2016.

FILGUEIRA, K. D. Tumor venéreo transmissível canino com localização primária e única em cavidade oral. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 38, n. 1, p. 91-94, 2010.

FILGUEIRA, K. D.; PEIXOTO, G. C. X.; FONSECA, Z. A. A. S.; PAIVA, A. L. C. Tumor venéreo transmissível canino com múltiplas localizações extragenitais. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 41, n. 1, 2013.

FLORÉZ, L. M. M.; FÊO, H. B.; ROCHA, N. S. Tumor venéreo transmissível canino: expressão dos genes MDR-1, TP53 e da família Bcl-2 e suas implicações no comportamento biológico e terapêutico. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**. v. 9, n.2, p. 281-292, 2014.

FREITAS, N. M. S. **Tumor venéreo transmissível em cães atendidos nos anos de 2007 e 2008 no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural da Amazônia**. 2009. 37 p. Monografia (Curso de Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Semiárido,

Belém, 2009.

GARCIA, M. R. C. M.; CALDERÓN, N.; FERREIRA, F. Consolidação de diretrizes internacionais de manejo de populações caninas em áreas urbanas e proposta de indicadores para seu gerenciamento. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 32, n. 2, p. 140-144, 2012.

GASPAR, L. F. J. **Caracterização citomorfológica do tumor venéreo transmissível canino correlacionada com danos citogenéticos, taxa de proliferação e resposta clínica à quimioterapia**. Tese. Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo, 2005.

GERARDI, D. G.; TINUCCI-COSTA, M.; SILVEIRA, A. C.; MORO, J. V. Expression of P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein, glutathione-S-transferase pi and p53 in canine transmissible venereal tumor. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 34, n. 1, p. 71-78, 2014.

GOKBULUT, C.; KARADEMIR, U.; BOYACIOGLU, M.; MCKELLAR, Q. A. Comparative plasma dispositions of ivermectin and doramectin following subcutaneous and oral administration in dogs. **Veterinary Parasitology**. v. 135, n. 3-4, p. 347-354, 2006.

GOLDSHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 4 ed. Jhon Wiley & Sons Inc. 2002. P. 115.

GOLOUBEFF, B.; OLIVEIRA, H. P. Tratamento criocirúrgico de tumor e de fístulas, em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 51, n. 5, p. 463-469, 1999.

GONZÁLEZ, C.; ESTEFANÍA, F.; GINO, C.; RAQUEL, C.; CÉSAR, L. Effect of vincristine chemotherapy on local leukocyte response to canine transmissible venereal tumor. **Avances en Ciencias Veterinarias**. v. 12, n. 1/2, 2000.

GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. **Annual Review of Biochemistry**. v. 62, n. 1, p. 385-427, 1993.

GRAMER, I.; LEIDOLF, R.; DÖRING, B.; KLINTZSCH, S.; KRÄMER, E. M.; YALCIN, E.; PETZINGER, E.; GEVER, J. Breed distribution of the nt230 (del4) MDR1 mutation in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 189, n. 1, p. 67-71, 2011.

GUREL, A.; KUSCU, B.; GULANBER, E. G.; ARUN, S. S. Transmissible venereal tumor detected in the extragenital organs of dogs. **Israel Journal of Veterinary Medicine**. v. 57, n. 2, p. 23-27, 2002.

HANTRAKUL, S.; KLANGKAEW, N.; KUNAKORNSWAT, S.; TANSATIT, T.; POAPOLATHEP, A.; KUMAGAI, S.; POAPOLATHEP, S. Clinical Pharmacokinetics and effects of vincristine sulfate in dogs with transmissible venereal tumor (TVT). **The Journal Veterinary Medical Science**. V.76, n. 12, p. 1549-1553, 2014.

HIGGINS, D. A. Observations on the canine transmissible venereal tumor as seen in the Bahamas. **Veterinary Record**. v. 79, n. 3, p. 67-71, 1966.

- HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**. v. 33, n. 10, p. 2148- 2154, 2010.
- HUPPES, R. R.; SILVA, C. G.; USCATEGUI, A. R.; NARDI, A. B.; SOUZA, F. W.; COSTA, M. T.; AMORIM, R. L.; PAZZINI, J. M.; FARIA, J. L. M. Tumor venéreo transmissível (TVT): estudo retrospectivo de 144 casos. **ARS Veterinária**. v. 30, n. 1, p. 13-18, 2014.
- HORTA, R. S.; FONSECA, L. S.; MIRANDA, D. F. H.; QUESSADA, A. M.; NETO, H. J. R.; SILVA, S. M. S. Tumor venéreo transmissível (TVT) com metástase para a glândula mamária. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 42, n. 1, 2014.
- HORTA, R. S.; VIANA, A. A. S.; QUEIROZ, A. T.; LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, M. R.; ARAÚJO, R. B. Diagnóstico diferencial entre sarcoma histiocítico e tumor venéreo transmissível com disseminação extragenital – relato de caso. **Clínica Veterinária**. v. 18, n. 98, p. 96-102, 2012.
- JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as target for anticancer drugs. **Nature Reviews Cancer**. v. 4, p. 253-265, 2004.
- JUAREZ, M.; SCHCOLNIK-CABRERA, A.; DUEÑAS-GONZALEZ, A. The multtargeted drug ivermectin: from na parasitic agente to a repositioned cancer drug. **American Journal of Cancer Research**. v. 8, n. 2, p. 317-331, 2018.
- KHALIL, A. M.; SAMRAH, H. M. A. In vivo combined treatment of rats with ivermectin and aged garlic extract attenuates ivermectin-induced cytogenotoxicity in bone marrow cells. **Research in Veterinary Science**. v. 120, p. 94-100, 2018.
- KLEGER, K.; HABIERSKI, A.; HAHN, K.; AMARILLA, S. P.; SEEHUSEN, F.; BAUMGÄRTNER, W. Vaginal canine transmissible venereal tumour associated with intra-tumoral Leishmania spp. amastigotes in an asymptomatic female dog. **Journal of Comparative Pathology**. v. 149, p. 156-161, 2013.
- KORYSTOV, Y. N.; ERMAKOVA, N. V.; KUBLIK, L. N.; LEVITMAN, M. K.; SHAPOSHNIKOVA, V. V.; MOSIN, V. V.; DRINYAEV, V. A.; KRUGLYAK, E. B.; NOVIK, T. S.; STERLINA, T. S. Avermectins inhibit multidrug resistance of tumor cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 493, n. 1, p. 57-64, 2004.
- LAPA, F. A. S. **Estudo comparativo da eficácia de dois protocolos de tratamento do tumor venéreo transmissível em cães**. Dissertação. Ciência Animal. Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE. Presidente Prudente, São Paulo, 2009.
- LESPINE, A.; DUPUY, J.; ORLOWSKI, S.; NAGY, T.; GLAVINAS, H.; KRAJCSJ, P.; ALVINERIE, M. Interation of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). **Chemico-Biological Interactions**. v. 159, n. 3, p. 169-179, 2006.
- LIAO, K. W. HUNG, S. W.; HSIAO, Y. W.; BENNETT, M.; CHU, R. M. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. **Veterinary Immunology and immunopathology**. v. 92, n. 3, p. 149-152, 2003.
- LIMA, C. R. O. **Classificação morfológica, critérios de malignidade, expressão gênica de**

**C-MYC e imunoistoquímica de C-MYC, p53, p21 e p27 no tumor venéreo transmissível.** 2013. 103 p. Tese (Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal) Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

LINARDI, R. L.; NATALINI, C. C. Multi-drug resistance (MDR1) gene and P-glycoprotein influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic of therapeutic drugs. **Ciência Rural.** v. 36, n.1, p.336-341, 2006.

LOMBARD, C.; CABANIE, P. Considerations on the nature and studies of the ultrastructure of the Sticker sarcoma of the dog. **Bulletin du Cancer.** v. 54, p. 357-365, 1967.

LOPES, R. M.; FERNANDES, E. S.; SOUZA, R. C.; SANTOS, A. M.; LANDIM, P. S. G. P.; SOUZA, S. V. Uso da associação de sulfato de vincristina e ivermectina no tratamento do TVT em cães- relato de caso. **Anais 37º Anclivepa.** 2016.

MAGALHÃES, A. M.; RAMADINHA, R. R.; BARROS, C. S. L.; PEIXOTO, P. V. Estudo comparativo entre citopatologia e histopatologia no diagnóstico de neoplasias caninas. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 21, n. 1, p. 23-32, 2001

MAGALHÃES, V. S.; CID, Y. P.; FERREIRA, T. P.; MEDEIROS, D. M. V.; BATISTA, L. C. S. O.; CORREIA, T. R.; ALBERT, A. L. M.; SCOTT, F. B. Evaluation of pharmacokinetics and efficacy of ivermectin following oral administration on dogs against experimental infection of *Ctenocephalides felis felis* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology.** v. 228, p. 167-171, 2016.

MANI, T.; BOURGUINAT, C.; KELLER, K.; ASHRAF, S.; BLAGBURN, B.; PRICHARD, R. K. Interaction of macrocyclic lactones with a *Dirofilaria immitis* P-glycoprotein. **International Journal of Parasitology.** v. 46, n. 10, p. 631-640, 2016.

MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; KAPLANSKI, C.; RIGAL, D.; MAGNOL, J. P. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** Amsterdam, v. 57, p.1-11, 1997.

MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. C.; TEIXEIRA, E. W.; SILVA, E. C. A.; RODRIGUES, R. R.; SOUZA, V. C. Plantas visitadas por abelhas africanizadas em duas localidades do estado de São Paulo. **Scientia Agricola.** v. 58, n. 2, p. 413-420, 2001.

MARTÍNEZ, M. M.; BALLUT, J. C.; CARDONA, J. A. Tumor venéreo transmissible (TVT) de localización extragenital. **MVZ-CÓRDOBA.** v. 7, n. 7, p. 168-170, 2002.

MASCARENHAS, M. B.; PEIXOTO, P. V.; RAMADINHA, R. R.; ARMIEN, G. A.; COSTA, S. Z.; MIRANDA, I. C.; NOGUEIRA, V.A. Immunohistochemical, lectin histochemical and ultrastructural studies of canine transmissible venereal tumor in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 37, n. 6, p. 613-620, 2017.

MASCARENHAS, M. B.; PEIXOTO, P. V.; RAMADINHA, R. R.; YAMASAKI, E. M.; COSTA, S. Z. R.; DRIEMEIER, D.; SONNE, L.; FRANÇA, T. N. Immunohistochemical study of genital and extragenital forms of canine transmissible venereal tumor in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 34, n. 3, p. 250-254, 2014.

MEALEY, K. L.; BENTJEN, S. A.; WAITING, D. K. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with ivermectin sensitivity in a sample population of Collies from the northwestern



United States. **American Journal of Veterinary Research**. v. 63, n.4, p. 479-481, 2002.

MEALEY, K. L.; FIDEL, J. P-Glycoprotein mediated drug interactions in animals and humans with cancer. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 29, n. 1, p. 1-6, 2015.

MIOT, H. A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**. v. 10, n. 4, 2011.

MIRANDA, B. C.; MICHELETTI, L.; FREITAS, A. G.; KUWARA, L. S.; ZOPPA, A. M. Tumor venéreo transmissível nasal em cão: relato de caso. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 9, n. 2, p. 50-51, 2011.

MORAES, K. G.; LOPES, R. R. F. B.; VIEIRA, A. A. R.; IBIAPINA, P. B.; RODRIGUES, N. M. Tumor venéreo transmissível canino com localização extragenital – relato de dois casos. **34º Congresso Brasileiro da Anclivepa**. Natal, RN, 2013.

MOSTACHIO, G. Q.; BUTTLER-PIRES, E. A.; APPARÍCIO, M.; CARDILLI, D. J.; VICENTE, W. R. R.; TONIOLLO, G. H. Tumor venéreo transmissível (TVT) canino no útero: relato de caso. **ARS Veterinária**. v. 23, n. 2, p. 71-74, 2007.

MOUDI, M.; GO, R.; YIEN, C. Y. S.; NAZRE, M. Alcalóides da Vinca. **International Journal of Preventive Medicine**. v. 4, n. 11, p. 1231-1235, 2013.

MUKARATIRWA, S.; GRUYS, E. Canine transmissible venereal tumor: Cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. **Veterinary Quarterly**. v. 25, n. 3, p. 101-111, 2003.

MURGIA, C.; PRITCHARD, J. K.; KIM, S. Y.; FASSATI, A.; WEISS, R. A. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. **Cell Press**. v. 126, n. 3, p. 477-487, 2006.

NAK, D.; NAK, Y.; CANGUL, I. T.; TUNA, B.; A clinic-pathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumor in dogs. **Journal of Veterinary Medicine Series A**. v. 52, n. 7, p. 366-370, 2005.

NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHERI, S. M.; RIOS, A.; PERKARZ, C. H. Prevalência de neoplasias em modalidades de tratamento em cães atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Arquivos of Veterinary Science**. v. 7, n. 2, p. 15-26, 2002.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 137p.

NELSON, R. W; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1468p.

OLIVEIRA, K. P.; PEREIRA, M. F.; SANTOS, F. L.; MENEZES, M. M.; WANDERLEY, G. G.; OLIVEIRA, N. M. C.; CUNHA, D. F. **Tumor venéreo transmissível na cavidade nasal em cães diagnosticado pelo exame citopatológico**. 2009. Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/eventosufrpe/jepex2009/cd/resumos/r1202-1.pdf>. Acessado em: 22 Dez. 2016.

OLIVEIRA, M. N.; BORGES, O. M. M.; CARNEIRO, R. R.; TORRES, L. M.; DANTAS, A.

K. P.; SOUZA, A. P. Aspectos clínicos do tumor venéreo transmissível canino (TVTc) linfoide, plasmocitoide e misto. **Ciência Animal**. v. 27, n. 2, p. 15-17, 2017.

OSTRANDER, E. A.; DAVIS, B. W.; OSTRANDER, G. K. Transmissible tumors: Breaking the cancer paradigm. **Trends Genetics**. v. 32, n. 1, p. 1-15, 2015.

OTTER, W. D.; HACK, M.; JACOBS, J. J. L.; TAN, J. F. V.; ROZENDAAL, L.; MOORSELAAR, J. A. V. Effective Treatment of Transmissible Venereal Tumors in Dogs with Vincristine and IL2. **Anticancer research**. v. 35, n. 6, p. 3385-3391, 2015.

PACHALY, J. R.; WERNER, P. R.; CIFFONI, E. M. G.; DANTAS, J. C.; WERNER, J.; TANAKA, N. M. Invasive and destructive transmissible venereal tumor in the nasal cavity of a dog- a case report. **Arquivo de ciências veterinárias e zoologia da UNIPAR**. v. 2, n. 1, p. 77-81, 1999.

PACHECO, J. Contribuição ao estudo anatômico da espécie *Catharanthus Roseus* (L) g. don var. *roseus* (*Apocynaceae*). **Rodriguésia**. v. 32, n. 52, p. 39-54, 1980.

PALKER, T. J.; YANG, T. J. Identification and physicochemical characterization of a tumor-associated antigen from canine transmissible venereal sarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 66, n. 4, p. 779-787, 1981.

PARADIS, M. Ivermectin in small animal dermatology. II. Extralabel applications. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian -North American Edition**. v. 20, n. 4, p. 459-469, 1998.

PARENT, R.; TEUSCHER, E.; MORIN, M.; BUYSCHAERT. Presence of the canine transmissible venereal tumor in the nasal cavity of dogs in the area of Dakar (Senegal). **The Canadian Veterinary Journal**. v. 24, n. 9, p. 287, 1983.

PEIXOTO, P. V.; TEIXEIRA, R. S.; MASCARENHAS, M. B.; FRANÇA, T. N.; AZEVEDO, S. C. S.; REINACHER, M.; COSTA, T. S.; RAMADINHAS, R. R. Formas atípicas e aspectos clínico-epidemiológicos do tumor venéreo transmissível canino no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 38, n. 2, p. 101-107, 2016.

PELETEIRO, M.C.; MARCOS, R.; SANTOS, M.; CORREIA, J.; PISSARRA, H.; CARVALHO, T. **Atlas de Citologia Veterinária**. 1 ed. Lisboa: Lidel, 2011. 308p.

PEREZ, R. R.; SILVA, M. A. M. L.; VARZIM, F. L. S. B.; OLIVEIRA, S. B.; HUCKE, E. E. T. S. Ação do decanoato de nandrolona (Deca-durabolin®) sobre parâmetros hematológicos e proteína total plasmática de ratos (*Rattus rattus*) com depressão medular induzida após administração de sulfato de vincristina (Oncovin®). **Ciência Rural**. v. 35, n. 1, p. 589-595, 2005.

POULIOT, J.F.; L'HEUREUX, F.; LIU, Z.; PRICHARD, R. K.; GEORGES, E. Reversal of Pglycoprotein-associated multidrug resistance by ivermectin. **Biochemical Pharmacology**. v. 53, p 17-25, 1997.

PRIEBE, A. P. S.; RIET-CORREA, G.; PAREDES, L. J. A.; COSTA, M. S. F.; SILVA, C. D. C.; ALMEIDA, M. B. Ocorrência de neoplasias em cães e gatos da mesorregião metropolitana de Belém, PA entre 2005 e 2010. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 63, n. 6, p. 1583-1586, 2011.

- PRIESTER, W. A. Skin tumors in domestic animals. Data from 12 United States and Canadian colleges of veterinary medicine. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 50, n. 2, p. 457-466, 1973.
- PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B. AFIP Laboratory Methods in Histotechnology. Washington: **American Registry of Pathology**, p. 278, 1992.
- PUROHIT, G. Canine Transmissible Venereal Tumor: A Review. **The Internet Journal of Veterinary Medicine**. v. 6, n. 1, 2008.
- PYE, R.; HAMEDE, R.; SIDDLE, H. V.; CALDWELL, A.; KNOWLES, G. W.; SWIFT, K.; KREISS, A.; JONES, M. E.; LYONS, A. B.; WOODS, G. M. Demonstration of immune responses against devil facial tumour disease in wild Tasmanian devils. **Biology Letters**. v. 12, n. 10, 2016.
- RAMADINHA, R. R.; TEIXEIRA, R. S.; BOMFIM, P. C.; MASCARENHAS, M. B.; FRANÇA, T. N.; PEIXOTO, T. C.; COSTA, S. Z. R.; PEIXOTO, P. V. Resposta do tumor venéreo transmissível canino à quimioterapia com sulfato de vincristina e vimblastina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 38, n. 1. P. 65-69, 2016.
- RANI, R. U.; PAZHANIVEL, N. Rare cases of primary canine extragenital transmissible venereal tumors. **International Journal of Advanced Veterinary Science Technology**. v. 4, n. 1, p 149-152, 2015.
- RIBEIRO, F. P.; FRIOLANI, M. Tumor venéreo transmissível extragenital em cães – relato de dois casos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v. 9, n. 17, 2011.
- RIBEIRO, I. ZAPPA, V. Tumor venéreo transmissível em cães. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v. 6, n. 11, 2008.
- ROCHA, T. M. M.; TERRES, M. F.; SOTELLO, A.; KOZENJAKIN, D.; MALUCELLI, L.; MAIA, R. Tumor venéreo transmissível nasal em um cão. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**. v. 6, n. 3, p. 349-353, 2008.
- RODRIGUES, G. N.; ALESSI, A.C.; LAUS, J. L. Intraocular transmissible venereal tumor in a dog. **Ciência Rural**. v. 31, n. 1, p. 141-143, 2001.
- ROMERO, R. R.; CIÉRCOLES, J. A. G. J.; GARZA, A. M. N.; TOVAR, L. E. R. Tumor venéreo transmissible con metástasis a un hemangioma esplénico en una perra. **Veterinaria México**. v. 41, n. 4, p. 305-312, 2010.
- SAID, R. A.; SILVA, L. F.; ALBUQUERQUE, A. R. O. L.; SOUSA-NETA, E. M.; LAVINSKY, M. O. Efficacy and Side Effects of Vincristine Sulphate Treatment on Canine Transmissible Venereal Tumour. **WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION**, 34., 2009, São Paulo. **Proceeding...** São Paulo: Wsawa Congress. 2009.
- SANTOS, F. G. A.; VASCONCELOS, A. C.; MORO, L.; NUNES, J. E. S.; PAIXÃO, T. A. Apoptose no tumor venéreo canino: características morfológicas e evidenciação bioquímica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 2001, n. 5, 2001.
- SANTOS, F. G. A.; VASCONCELOS, A. C.; NUNES, J. E. S.; CASSALI, G. D.; PAIXÃO, T. A.; MORO, L. O tumor venéreo transmissível canino – aspectos gerais e abordagens

moleculares (revisão de literatura). **Biosciene Journal**. v. 21, n. 3, p. 41-53, 2005.

SARTOR, I.F.; BICUDO, P.L. Agentes empregados no controle de ectoparasitas. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.480-492.

SILVA, C. R.; BAJA, K. G.; NATALINI, C. C.; PEREIRA, K. S. S.; AGUIAR, P. R. L. Mutação MDR1-nt230(del4) em cães da raça Collie. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**. p. 23-28, 2011.

SILVA, M. C. V.; BARBOSA, R. R.; SANTOS, R. C.; CHAGAS, R. S. N.; COSTA, W. P. Avaliação epidemiológica, diagnóstica e terapêutica do tumor venéreo transmissível (TVT) na população canina atendida no hospital veterinário da UFERSA. **Acta Veterinária Brasília**. v. 1, n.1, p. 28-32, 2007 a.

SILVA, M. C. V.; DALECK, C. R.; RAMOS, R. S.; NARDI, A. B.; MARTINS, M. R.; CALAZANS, S. G.; EURIDES, D. Primary intranasal transmissible venereal tumor with bone lyses of the maxilla and metastasis- case report. **ARS Veterinária**. v. 23, n. 1, p. 54-58, 2007 b.

SILVA, D. M.; REUSING, M. S. O.; FRANCIOSI, A. I.; BELO, C. E. P.; GONÇALVES, K. A.; DE SOUSA, R. S.; GUÉRIOS, S. D. Treatment of canine transmissible venereal tumor using L-asparaginase, prednisone, and surgery in a clinical chemotherapy-resistance case. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**. v.38, n.2, p. 220-223, 2014.

SIMERMANN, N. F. S. **Sulfato de vincristina no tratamento do tumor venéreo transmissível frente à caracterização citomorfológica**. Dissertação. Ciência Animal. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, Goiás, 2009.

SOBRAL, R.A; TINUCCI-COSTA, M; CAMACHO, A.A. Ocorrência do tumor venéreo transmissível em cães na região de Jaboticabal, Brasil. **ARS Veterinária**, v.14, n.1, p.110, 1998.

SOTO, F. R. M.; RISSETO, M. R.; PINHEIRO, S. R.; SOUSA, A. J.; PORTELA, M. C.; LIMA, B. F. M. S. Avaliação de experiência com programa educativo de posse responsável em cães e gatos em escolas públicas de ensino fundamental da zona rural do município de Ibiúna, SP, Brasil. **Revista Ciência em Extensão**, v. 2, n. 2, p. 11-21, 2006.

SOUSA, F. B. **Auto-terapia como terapia auxiliar no tumor venéreo transmissível**. 2009, 20 p. Monografia (Especialização *Latu Sensu*) - Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais- UCB, Goiânia, 2009.

SOUSA, J.; SAITO, V.; NARDI, A. B.; RODASKI, S.; GUÉRIOS, S. D.; BACILA, M. Características e incidência do tumor venéreo transmissível (TVT) em cães e eficiência da quimioterapia e outros tratamentos. **Archives of Veterinary Science**. v. 5, n. 1, p. 41-48, 2000.

SOUZA, C. O.; MENDONÇA, G. B. N. Eletroestimulação de baixa intensidade para redução de tumor em cão. **Acta Veterinária Brasília**. v. 3, n. 3, p. 159-162, 2009.

SOUZA, T. M.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 555-560, 2006.

- STICKER, Anton. Transplantables lymphosarkom des hundes. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 1, n. 1, p. 413-444, 1904.
- STRAKOVA, A.; MURCHISON, E. The changing global distribution and prevalence of canine transmissible venereal tumour. **BMC Veterinary Research**. v.10, n. 168, 2014.
- SUDJAIDEE, P.; THEEWASUTRAKUL, P.; TECHARUNGCHAIKUL, S.; PONGLOWHAPAN, S.; CHATDARONG, K. Treatment of canine transmissible venereal tumor using vincristine sulfate combined with l-asparaginase in clinical vincristine-resistant cases: a case report. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**. v. 42, n. 1, p. 117-122, 2012.
- TINUCCI-COSTA, M. O tumor venéreo transmissível canino. **Revista de Educação continuada CRMV-SP**. v. 2, n. 3, p. 46-52, 1999.
- TINUCCI-COSTA, M. CASTRO. Tumor venéreo transmissível. In: DALECK, C. R. **Oncologia em Cães e Gatos**. 2 ed. Rio de Janeiro: ROCA, 2016. P. 673-687.
- UJVARI, B.; PAPPENFUSS, A. T.; BELOV, K. Transmissible cancers in an evolutionary context. **BioEssays**. v. 38, p. 14-23, 2016.
- VALADÃO, M. L.; SCARPELLI, K. C.; METZE, K. Clinical utility of a life quality score in dogs with canine transmissible venereal tumor treated by vincristine chemotherapy. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 62, n. 5, p. 1086-1093, 2010.
- VALENÇOLA, R. A.; ANTUNES, T. R.; SORGATTO, S.; OLIVEIRA, B. B.; GODOY, K. C. S.; SOUZA, A. I. Aspectos citomorfológicos e frequência de subtipos do tumor venéreo transmissível canino no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Veterinária Brasileira**. v. 9, n. 1, p. 82-86, 2015.
- VIANA, F. A. B. **Guia terapêutico veterinário**. 3 ed. Lagoa Santa: Gráfica e Editora CEM, 2014. P. 560.
- VIÉRA, R. B. **Toxicidade do cloridrato de doxorubicina na dose de 120mg/m<sup>2</sup>, em cadelas com tumor venéreo transmissível**. Dissertação. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. Jaboticabal, São Paulo, 2015.
- VIÉRA, R. B. **Toxicidade do cloridrato de doxorubicina na dose de 120mg/m<sup>2</sup>, em cadelas com tumor venéreo transmissível**. Dissertação. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. Jaboticabal, São Paulo, 2015.
- VURAL, S. A.; HAZIROGLU, R.; VURAL, M. R.; POLAT, I. M.; TUNC, A. S. Detection of progressive and regressive phase and LINE-1 retrotransposon in transfected dogs with transmissible venereal tumor during chemotherapy. **Journal of veterinary Science**. v. 19, n. 5, 620-626, 2018.
- VONHOLDT, B. M. OSTRANDER, E. A. The singular history of a canine transmissible tumor. **Cell Press**. v. 126, n. 3, p. 445-447, 2006.
- YANG, T.J. Metastatic transmissible venereal sarcoma in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.190, n.5, p.555-556, 1987.

YIN, T. T.; WANG, L.; WANG, G. D. Recent advances in transmissible tumors. **Yi Chuan**  
= **Hereditas**. v. 37, n. 11, p. 1086-1094, 2015.

## ANEXO 1- Termo de consentimento livre e esclarecido

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**HOSPITAL-ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O presente termo tem o objetivo de informar ao (a) guardião (ã) do animal quanto aos principais aspectos relacionados ao atendimento clínico no projeto “Farmacocinética de drogas no tratamento de tumor venéreo transmissível em cães”, sob cujas regras o cão será avaliado e tratado, complementando as informações prestadas pelo (a) seu (sua) médico (a) veterinário (a) e pela equipe de pesquisadores e médicos veterinários pertencentes ao projeto, no Hospital-Escola de Medicina Veterinária da UFBA (Equipe Atendimento TVT-HOSPMEV-UFBA).

Eu, \_\_\_\_\_, nascido em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_, portador do RG/CPF \_\_\_\_\_, declaro que fui devidamente informado (a) sobre o protocolo aplicado pela Equipe Atendimento TVT – HOSPMEV - UFBA, sendo o meu cão de nome \_\_\_\_\_, sexo \_\_\_\_\_, raça \_\_\_\_\_, idade \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, submetido a triagem a partir da avaliação por meio de coleta de amostras de sangue, urina, citologia, biópsia para exame histopatológico pertencente ao projeto “Farmacocinética de drogas no tratamento de tumor venéreo transmissível em cães”. Parte das coletas dessas amostras serão mediante sedação, com o objetivo de tranquilizar e evitar a dor do animal para a execução dos procedimentos.

Declaro estar ciente de que tanto os procedimentos de colheita de amostras quanto os medicamentos podem implicar riscos à saúde do meu animal, sob a forma de reações adversas ou reações idiossincrásicas (reações adversas ainda não descritas no cão) aos fármacos utilizados em qualquer etapa do diagnóstico ou tratamento, ou ainda de possibilidades de acidentes devido ao uso de instrumentos perfurantes, associados ou não ao próprio estado de saúde do cão portador de tumor venéreo transmissível. Estou ciente de que embora todos os riscos sejam possíveis, os métodos previstos no protocolo são de extrema importância para o tratamento adequado do animal e para impedir a transmissão da doença para outros cães. Todos os procedimentos serão realizados por médicos veterinários treinados, o que minimiza a possibilidade de ocorrências adversas.

Para participação deste cão no estudo, estou ciente de que é necessário seguir todas as prescrições realizadas pelos médicos veterinários e comunicar qualquer alteração manifestada pelo animal durante todo o período de tratamento. Caso na triagem seja confirmado que o animal é portador de tumor venéreo transmissível, o animal iniciará o tratamento mediante o seu estado clínico. Quando iniciado o tratamento o animal deverá retornar ao hospital semanalmente, para acompanhamento e realização das sessões de quimioterapia, até que a neoplasia tenha regredido totalmente. Em um dos retornos o animal deverá ser mantido no Hospital-Escola de Medicina Veterinária, por pelo menos 12 horas, acompanhado do seu guardião (ã), para que sejam realizadas as colheitas de sangue referentes ao projeto, que serão feitas nos intervalos de tempo de 0, 5, 10, 15, 30 e 45 minutos e 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas após a aplicação do quimioterápico. Esse cronograma de retornos deve ser respeitado até o final do estudo. Declaro estar ciente de que a cada retorno serão realizados novos exames de rotina clínico-laboratorial e de que arcarei com os custos dos exames, pois o objetivo é acompanhar a eficiência do tratamento.

Confirmo que recebi explicações, li, compreendo e concordo com tudo que me foi esclarecido e que me foi concedida a oportunidade de anular, questionar, alterar qualquer espaço, parágrafo ou palavras com as quais não concordasse. Tive a oportunidade de fazer perguntas que me foram respondidas satisfatoriamente. Assim, tendo conhecimento, autorizo a realização do procedimento proposto em meu animal.

Salvador, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura guardião (a) do cão

\_\_\_\_\_  
Assinatura / CRMV  
Responsável da Equipe Atendimento TVT – HOSPMEV – UFBA

ANEXO 2- Certificado de autorização da Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Escola de Medicina e Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia

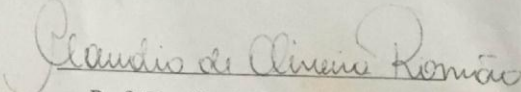
	UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
--	--	--

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada **Diagnóstico e farmacocinética de drogas no tratamento de tumor venéreo transmissível em cães**, registrada com o nº **68/2017**, sob a responsabilidade da **Professora Stella Maria Barrouin Melo**, e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, **em reunião de 14/11/2017**.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	14/10/2017 a 01/10/2018
Espécie/linhagem/raça	<i>Canis lupus familiaris</i>
Nº de animais	6
Peso/Idade	10-30kg / 1 a 10 anos
Sexo	Ambos
Origem	Ambulatório HOSPMEV

Salvador, 14 de novembro de 2017.

  
 Prof. Claudio de Oliveira Romão  
 Coordenador CEUA/EMEVZ-UFBA

Av. Ademar de Barros, 500. Ondina - 40.170-110. Salvador - Bahia - Brasil Fone: (071) 3283-6701/6702/6706 - Fax: 3245-2813/3283-6718 E-mail: <a href="mailto:escmv@ufba.br">escmv@ufba.br</a> Home-page: <a href="http://www.ufba.br/~escmv">http://www.ufba.br/~escmv</a>
--



ANEXO 3 – Características individuais dos cães do G-Vin e G-Vin/Iv atendidos no HOSPMEV-UFBA no período de janeiro de 2017 a agosto de 2018

Identidade	Sexo	Idade	Nódulos	Raça	Citologia	Metástase	Tipo de tumor	Grupo	Nº aplicações de vincristina	Nº aplicações de ivermectina	Alta	Tempo de tratamento
	Macho (M) Fêmea (F)	Anos	Únicos=1 Múltiplos=2	RD= raça definida SRD= sem raça definida	P=Plasmocitoide/ L= Linfocitoide/ M= Misto	Sim/ Não	G= Genital E=Extragenital GE= Genital e extragenital	G-Vin= 1/ G-Iv/Vin = 2	Até remissão total do tumor		Sim Não	Semanas
<b>Cão 1</b>	M	10	1	RD	P	Não	E	1	1	0	Sim	4
<b>Cão 2</b>	F	3	1	SRD	L	Não	G	1	4	0	Sim	4
<b>Cão 3</b>	M	4	1	SRD	P	Não	G	1	4	0	Sim	4
<b>Cão 4</b>	F	5	1	SRD	L	Não	G	1	3	0	Sim	3
<b>Cão 5</b>	F	5	1	SRD	M	Não	G	1	4	0	Sim	4
<b>Cão6</b>	M	10	1	SRD	P	Não	G	1	7	0	Sim	12
<b>Cão 7</b>	F	6	1	SRD	P	Não	G	1	3	0	Sim	4
<b>Cão 8</b>	F	1	1	SRD	L	Não	G	1	4	0	Sim	4
<b>Cão 9</b>	M	7	1	SRD	M	Não	G	1	4	0	Sim	5
<b>Cão 10</b>	M	11	1	SRD	P	Não	G	1	7	0	Sim	8

Continua...

---

<b>Cão 11</b>	F	4	1	SRD	M	Sim	GE	2	4	2	Sim	4
<b>Cão 12</b>	M	5	1	SRD	P	Não	E	2	4	2	Sim	4
<b>Cão 13</b>	F	6	1	SRD	P	Não	G	2	3	2	Sim	3
<b>Cão 14</b>	M	3	2	SRD	P	Não	G	2	6	3	Sim	6
<b>Cão 15</b>	F	10	1	RD	L	Não	E	2	3	2	Sim	3
<b>Cão 16</b>	F	5	1	RD	P	Não	G	2	5	3	Sim	5
<b>Cão 17</b>	F	2	1	SRD	P	Não	G	2	2	1	Sim	2
<b>Cão 18</b>	F	5	1	SRD	P	Não	G	2	5	3	Sim	5
<b>Cão 19</b>	F	7	1	SRD	M	Não	G	2	3	2	Sim	3
<b>Cão 20</b>	F	1	2	SRD	M	Sim	E	2	8	4	Sim	8

---