

KARINA OLIVEIRA DRUMOND

AUTOHEMOTERAPIA, VINCRISTINA E ASSOCIAÇÃO DOS DOIS TRATAMENTOS NO  
TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO

TERESINA, 2009

KARINA OLIVEIRA DRUMOND

AUTOHEMOTERAPIA, VINCRISTINA E ASSOCIAÇÃO DOS DOIS TRATAMENTOS NO  
TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**Área de Concentração:** Sanidade e Reprodução Animal

**Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Quessada**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva**

TERESINA, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA  
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

D795a Drumond, Karina Oliveira.  
Autohemoterapia, vincristina e associação dos dois tratamentos no tumor venéreo transmissível canino [manuscrito] / Karina Oliveira Drumond. – 2009.  
82 f.

Impresso por computador (printout).  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2009.  
“Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Quessada”.

1. Cão – Doenças – Sistema Genital. 2. Cão – Doenças – Tratamento. 3. Neoplasias – Terapia. 4. Medicina Veterinária.  
I. Título.

CDD 636.089

**AUTOHEMOTERAPIA, VINCRISTINA E ASSOCIAÇÃO DOS DOIS TRATAMENTOS  
NO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO**

Karina Oliveira Drumond

Dissertação Aprovada em: 09/03/2009

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Ana Maria Quessada – CCA/UFPI  
Orientadora

---

Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos – ICB/UFMG  
Examinador Externo

---

Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa – CCA/UFPI  
Examinador Interno

Aos meus generosos pais, José Drumond e Maria Teresa, pelo esforço que sempre fizeram para que eu conseguisse alcançar meus objetivos.

Aos meus queridos irmãos, Carolina e André, pelo incentivo em todos os momentos.

Aos meus lindos sobrinhos, Maria Carolina e Flávio Filho, que me iluminam com um simples sorriso. Amo vocês.

Ao meu namorado, José Cardoso, pelo amor dedicado, companheirismo e pela lealdade.

A eles dedico esse trabalho!

“A vitória do sucesso é metade conquistada quando se ganha o hábito de estabelecer metas e alcançá-las. Mesmo a mais entediante rotina torna-se interessante quando se caminha a cada dia convencido de que toda tarefa torna mais perto conquistar seus sonhos.”

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me acompanhar em todos os meus passos.

À Universidade Federal do Piauí e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo apoio financeiro, proporcionando condições para realização dessa pesquisa.

À Profa. Dra. Ana Maria Quessada, pela amizade, por seus ensinamentos tanto científicos como de vida, e pelo seu imenso incentivo durante os anos que me orientou. Obrigada por sempre ser prestativa em todos os momentos e por me mostrar quais caminhos seguir para que tudo dê certo.

À Profa. Dra. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva, por me acolher no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal do Piauí (UFPI) e me proporcionar muito aprendizado, e pela co-orientação.

Ao Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa, pela generosidade e muita paciência em colaborar com essa pesquisa. Pelo grande interesse em ensinar e por contribuir para que seus alunos sejam bons profissionais. E por aceitar participar da banca examinadora dessa dissertação.

Ao Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos, por aceitar participar da banca examinadora dessa dissertação e pelas contribuições que feitas para melhorá-la.

Aos funcionários da Gerência de Zoonoses de Teresina, PI, em particular, ao médico veterinário Fernando Luiz Lima de Oliveira, por terem cedido os animais utilizados no projeto.

Aos Luís Gomes da Silva, Vicente e Laelma, funcionários da Pós-Graduação, por serem prestativos nos momentos solicitados.

Aos professores da Pós-Graduação, pelos conhecimentos adquiridos e que serão transmitidos.

À minha família, que mesmo longe, esteve sempre perto.

À minha avó, por me acolher em sua casa nesses dois anos de mestrado.

Ao meu namorado, Cardoso, pela compreensão, paciência, pelo carinho e pela colaboração em todas as etapas dessa pesquisa.

À Lucilene dos Santos Silva, que sempre esteve disposta a ajudar, principalmente nos momentos difíceis. Obrigada pela palavra amiga e pelo carinho.

À Flaviane Alves de Pinho, pelo exemplo de solidariedade. Sempre usando seu tempo em favor dos outros. Obrigada pela imensa colaboração que prestou a mim e pelos ensinamentos transmitidos.

À Larissa Maria Feitosa Gonçalves, pelo companheirismo, pela amizade e colaboração no Laboratório de Patologia Animal (UFPI).

À profa. Ana Lys Barradas Bezerra Mineiro, pelos momentos de descontração que passamos juntas no Laboratório de Patologia Animal (UFPI).

Aos técnicos do Laboratório de Patologia Animal (UFPI), Brás e Sr. Manoel de Jesus, pela boa vontade e contribuição à dissertação.

À residente do Laboratório de Patologia Animal (UFPI), Sammya Roberta de Vasconcelos Barbosa, pela colaboração quando solicitada.

À Raquel Teixeira de Sousa e Sr. Luisinho, funcionários do Laboratório de Patologia Animal.

Ao diretor do Hospital Veterinário Universitário (HVU) da UFPI, João Macedo de Sousa, por ter cedido o espaço para a realização de parte dessa pesquisa.

Ao Rallyson Ramon Fernando Barbosa Lopes, pela grande colaboração prestada no HVU, dedicação e amizade.

Ao professor Antônio Francisco de Sousa, por ter cedido o Laboratório de Patologia Clínica para realização de exames.

Aos funcionários de Laboratório de Patologia Clínica do HVU, Wellson Andrade de Oliveira, Paula Francinete da Silva Brazil Almeida e Antônio Carlos Martins Portela, pela colaboração na realização de exames.

Às residentes do HVU, Rosa Maria dos Santos Melo, Rebeca Takemoto, Joelma Borba e Sara Sobral, pela amizade, convívio e disponibilidade.

Aos enfermeiros do HVU, Sanatiel de Oliveira Bacelar e James Radijo de Moura Santos, por sempre serem prestativos e se desdobrarem para colaborar com o projeto.

Aos funcionários do HVU, Suelen dos Santos Garcia, Jaciara Mendes dos Santos, Delvane de Araújo e Silva, Maria do Socorro Viana dos Santos e Gerlan Vieira de Sousa, pela grande colaboração.

Aos colegas de turma da Pós-Graduação, pela reciprocidade de conhecimentos e pelos momentos agradáveis de convívio.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 CAPÍTULO:	
<b>Autohemoterapia, vincristina e associação dos dois tratamentos no tumor venéreo transmissível canino .....</b>	<b>11</b>
ABSTRACT .....	11
RESUMO .....	12
2.1 INTRODUÇÃO .....	14
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	16
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
2.4 CONCLUSÕES .....	33
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
3 ANEXO .....	43

## RESUMO

A proposta desse trabalho foi avaliar o comportamento do tumor venéreo transmissível de ocorrência natural após o tratamento com autohemoterapia em comparação ao tratamento com vincristina e associação dos dois métodos terapêuticos. Foram utilizadas 18 cadelas, adultas, divididas aleatoriamente em três grupos iguais ( $n = 6$ ). As cadelas do grupo 1 (G1) foram tratadas com vincristina (0,025mg/kg, uma vez por semana, máximo de sete aplicações). No grupo 2 (G2) as cadelas foram tratadas com autohemoterapia (5,0 ou 10,0 ml, uma vez por semana, sete aplicações). No grupo 3 (G3) foram tratadas com associação de vincristina (0,025mg/kg) e autohemoterapia (5,0 ou 10,0 ml) uma vez por semana, com o máximo de sete aplicações. Avaliações macroscópicas (mensuração da massa tumoral), microscópicas (citológico, histopatológico, imunohistoquímica com Ki-67 e detecção de apoptose), hematológicas e bioquímicas foram realizadas. A regressão da massa tumoral foi observada de forma significativa apenas no G1 ( $p > 0,0001$ ) e G3 ( $p > 0,0001$ ), não havendo diferença no G2 ( $p = 0,853$ ) antes e após o tratamento, embora tenha sido observada regressão da massa tumoral em três animais do G2. Não houve diferença significativa ( $p = 0,5732$ ) na contagem de células em proliferação entre os animais do G1 e G3, porém houve diferença significativa ( $p = 0,00549$ ) entre os animais do G2 e os demais grupos. A contagem de células em proliferação diminuiu e chegou a zero no decorrer do tratamento (G1 e G3). A contagem de células apoptóticas não diferiu de forma significativa entre os três grupos, mas após o tratamento houve aumento dessas células nos animais do G1 e G3. O mesmo não foi observado no G2. Ocorreram efeitos colaterais (apatia, inapetência, alopecia, vômito e diarreia) em alguns animais do G1 e G3, atribuídos à quimioterapia. A vincristina também provocou alterações hematológicas (anemia, trombocitopenia ou trombocitose e leucopenia) no G1 e G3, mas não provocou alterações bioquímicas. Os animais tratados com a autohemoterapia não apresentaram efeito colateral. Concluiu-se que a autohemoterapia promoveu regressão macroscópica parcial da massa tumoral em 50% dos animais submetidos a esse tratamento, o que vem estimular o aprofundamento de pesquisas nesta área.

Palavras-chave: Cão – Doenças – Sistema Genital. Cão – Doenças – Tratamento. Neoplasias – Terapia. Medicina Veterinária.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the behavior of the canine transmissible venereal tumor with natural occurrence after treatment with autohemotherapy compared to treatment with vincristine and association of the two treatment methods. Eighteen bitches, adult, were used, randomly divided into three equal groups (n = 6). The bitches in Group 1 (G1) were treated with vincristine (0.025mg/kg once per week, maximum of seven applications). In group 2 (G2), the bitches were treated with autohemotherapy (5.0 or 10.0 ml once a week, seven applications). In group 3 (G3) were treated with combination of vincristine (0.025mg/kg) and autohemotherapy (5.0 or 10.0 ml) once a week, with a maximum of seven applications. Macroscopic evaluation (measurement of the tumoral mass), microscopic (cytologic, histopathological, immunohistochemistry with Ki-67 and apoptosis), hematological and biochemical profile were made. The regression of tumor mass was observed in a significant way only in G1 ( $p > 0,0001$ ) and G3 ( $p > 0,0001$ ), with no difference in G2 ( $p = 0,853$ ) were detected between before and after treatment, although the tumor regression occurred in three animals of G2. There was no significant difference ( $p = 0,5732$ ) in the counting of cell proliferation between animals from G1 and G3, but there was no significant difference ( $p = 0,00549$ ) between the G2 and bitches of the other groups. The counting of cell proliferation decreased and reached zero in the course of treatment (G1 and G3). The number of apoptotic cells did not differ significantly between the three groups, but occurred increase not significant of these cells after treatment in the animals of G1 and G3. The same was not observed in G2. Side effects were observed (apathy, inappetence, alopecia, vomiting and diarrhea) in some animals of G1 and G3 and were attributed to chemotherapy. The vincristine also cause hematological abnormalities (anemia, leukopenia and thrombocytopenia or thrombocytosis) in G1 and G3, but did not cause biochemical changes. The treated animals with autohemotherapy did not present side effect. It was concluded that the macroscopic autohemotherapy promoted partial regression of tumor mass in 50% of animals undergoing this treatment. Thus, futher research in this area are necessary to better elucidate this inquiry.

Key-words: Dog – Diseases – Genital System. Dog – Diseases – Treatment. Neoplasms – Therapy. Veterinary Medicine.

## **1 INTRODUÇÃO**

A prevalência de neoplasias em cães está aumentando consideravelmente (DE NARDI et al., 2002; PIRES; TRAVASSOS; PIRES, 2003). A crescente incidência das afecções neoplásicas nessa espécie tem várias razões, entre elas está a maior longevidade observada nesses animais. Desta forma, as neoplasias constituem uma das principais causas de óbito entre os cães (BENTUBO et al., 2007).

Com base nesses aspectos, existe um grande interesse na obtenção de conhecimentos sobre tratamento, associado ao estudo do comportamento das neoplasias. Entre as principais neoplasias que acometem os cães encontra-se o tumor venéreo transmissível (TVT) (DE NARDI et al., 2002; PIRES; TRAVASSOS; PIRES, 2003).

Com toda sua complexidade o TVT se torna um excelente modelo para investigar a interação entre a regressão tumoral e o sistema imune em resposta ao tratamento tanto quimioterápico como por meio de métodos alternativos, entre eles, a autohemoterapia. Considerando que este tumor é de fácil transplantação e crescimento o TVT é um forte candidato para a pesquisa dessa neoplasia antes e após a instituição de protocolos de tratamento.

### **1.1 Tumor Venéreo Transmissível**

O tumor venéreo transmissível, também conhecido como “tumor de Sticker”, granuloma venéreo, linfossarcoma venéreo, condiloma canino ou sarcoma transmissível (NASCIMENTO; SANTOS, 1997), é uma neoplasia de células redondas, que acomete cães de ambos os sexos. O TVT é transmitido, principalmente, pelo coito (JOHNSON, 1994). Também pode se transplantado mecanicamente por meio de lambeduras, mordeduras e arranhões ou qualquer outro meio que produza escoriações ou soluções de continuidade na pele ou mucosas (O’KEEFE, 1997; MARTINEZ; BALLUT; CARDONA, 2002).

A etiologia ainda não foi descoberta. Alguns autores acreditam que o TVT seja causado por vírus, embora nenhum agente tenha sido isolado (NASCIMENTO; SANTOS, 1997). Sugere-se que o TVT apresente origem histiocítica. Marcadores histiocíticos como o anticorpo monoclonal murino contra macrófagos caninos (ACM1) (MARCHAL et al., 1997), antitripsina alfa-1 e lisozima (MOZOS et al., 1996) foram usados para confirmar seu imunofenótipo e fornecer informações sobre sua origem. As células do TVT apresentaram imunorreatividade para esses tipos de marcadores sugerindo que essa neoplasia tenha um imunofenótipo histiocítico (MOZOS et al., 1996; MARCHAL et al., 1997; PARK et al., 2006). A presença de formas

amastigotas de *Leishmania* no citoplasma de células de TVT reforça esse tipo de origem (CATONE et al., 2003).

O TVT é encontrado em todo o mundo, sendo mais comum em países de climas tropicais e em áreas com grandes populações de cães vadios (O'KEEFE, 1997). No Brasil é conhecido em todo o país (VARASCHIN et al., 2001; SOUSA et al., 2000; AMARAL et al., 2004; SILVA et al., 2007). A prevalência do TVT parece variar amplamente com a localização geográfica (JOHNSON, 1994). Em algumas regiões a prevalência é mais alta em cães machos que fêmeas (AMARAL et al., 2004; BATISTA et al., 2007). Em outras regiões a prevalência é mais alta em cadelas. Não foi constatada uma raça mais susceptível ao aparecimento do TVT, mas um grupo de risco formado em sua grande maioria por animais mestiços (SOUSA et al., 2000; SILVA et al., 2007). A faixa etária também apresenta variações regionais. A idade de maior frequência é de quatro anos (AMARAL et al., 2004), certamente relacionado ao período correspondente a maior maturidade e atividade sexual (SILVA et al., 2007).

Inicialmente o TVT é pequeno, saliente e hiperêmico. À medida que vai crescendo, em geral, assume aspecto similar ao de couve-flor, torna-se muito friável e sangra facilmente (JOHNSON, 1994; O'KEEFE, 1997). É pouco infiltrativo e raramente apresenta metástase (NASCIMENTO; SANTOS, 1997). Pode atingir o tamanho de 5 cm ou mais (JOHNSON, 1994). Em cães machos os tumores estão comumente localizados na base do pênis ou na mucosa prepucial. Na cadela é mais frequente na mucosa vaginal e vulvar (O'KEEFE, 1997), podendo aparecer também no colo uterino (VARASCHIN et al., 2001).

As principais queixas no atendimento clínico de animais acometidos pela enfermidade são: massa na genitália externa ou corrimento sanguinolento prepucial ou vulvar (JOHNSON, 1994). Lamedura da genitália, lesão ulcerativa da pele e da superfície tumoral, dificuldade de exposição peniana, necrose e infecção bacteriana também são observadas (VARASCHIN et al., 2001; SILVA et al., 2007). A localização intranasal está usualmente associada com epistaxe (MYLONAKIS et al., 2008) ou rinite crônica acompanhada de secreção mucopurulenta (VARASCHIN et al., 2001). A localização ocular geralmente provoca cegueira (RODRIGUES; ALESSI; LAUS, 2001; BATISTA et al., 2007). O TVT de localização genital pode levar à disúria, devido à obliteração do orifício uretral, produzindo incidência elevada de infecção do aparelho urinário (BATAMUZI; KRISTENSEN, 1996).

Alguns tumores provocam metástases nos linfonodos regionais, no períneo ou no escroto. As metástases parecem ser mais prováveis com tumores existentes há mais de um mês. É rara a existência de metástases em pontos distantes, tais como nos pulmões, nas vísceras abdominais ou no sistema nervoso central (JOHNSON, 1994). O TVT já foi diagnosticado no fígado, baço,

pulmão, rim (AMARAL et al., 2004; PARK et al., 2006), peritônio (AMARAL et al., 2004), linfonodos ilíacos (SOUSA et al., 2000), omento e tonsila (VARASCHIN et al., 2001). A localização extragenital em órgãos como o cérebro, olho, pulmão e coração agravam o prognóstico da neoplasia, por reduzir a qualidade de vida e comprometer a função de órgãos vitais (BATISTA et al., 2007).

O diagnóstico clínico do TVT é geralmente feito pelo aspecto físico do tumor localizado na genitália externa. Porém a confirmação diagnóstica é realizada por meio de citologia esfoliativa (“imprints”), aspiração por agulha fina ou histopatologia. O exame citológico é uma técnica prática e eficaz para o diagnóstico do TVT (SILVA et al., 2007). O aspecto citológico é muito característico. Observa-se uma população homogênea de grandes células redondas ou ovais (diâmetro de 15 a 30  $\mu\text{m}$ ) contendo núcleo redondo único ou de tamanhos variados, com pequena proporção núcleo:citoplasmática e citoplasma basofílico frequentemente vacuolizado. A cromatina nuclear é única e proeminente. O nucléolo localiza-se centralmente. São comuns as figuras mitóticas, células inflamatórias e corpos apoptóticos (GONZALEZ et al., 2000; SANTOS, 2002). Pode ter aspecto plasmocitóide, linfocitóide ou linfoplasmocitóide (misto) (AMARAL et al., 2004).

Histologicamente observam-se células grandes, redondas ou ovais com citoplasma escasso e bem definido arranjado em grupos compactos. A cromatina nuclear é fina e difusamente distribuída. O núcleo é ovóide e grande, contendo nucléolo proeminente e centralmente localizado (GONZALEZ et al., 2000). As células do TVT lembram outros tumores de células redondas. Os diagnósticos diferenciais, especialmente de lesões não genitais, incluem tumor de mastócitos, histiocitoma e linfoma (JOHNSON, 1994).

Outras formas de diagnóstico também podem ser usadas, como é o caso da imunohistoquímica. Muitos trabalhos encontrados na literatura fazem uso dessa técnica (MARCHAL et al., 1997; PEREZ; DAY; MOZOS, 1998; GONZALEZ et al., 2000; HSIAO et al., 2002; SANTOS, 2002; LIAO et al., 2003; PARK et al., 2006). A imunohistoquímica tem grande importância diagnóstica, pois permite compreender a biologia tumoral e prover estimativas de prognóstico da doença com ou sem tratamento. Para isso são utilizados marcadores celulares, entre os quais se destaca o anticorpo Ki-67 (SANTOS et al., 2005).

O tratamento é recomendado na maioria dos casos, devido ao pequeno risco de metástases. A escolha do tratamento é influenciada pela localização do tumor, presença ou ausência de metástases e pelos métodos terapêuticos disponíveis (JOHNSON, 1994).

A vincristina tem sido uma das drogas mais utilizadas pelos clínicos veterinários para o tratamento do TVT. Age nas células tumorais bloqueando a divisão celular (mitose)

interrompendo a metáfase (ANDRADE et al., 1999). É administrada uma vez por semana como um agente único com duração total do tratamento, em geral, de quatro a sete semanas (SILVA et al., 2007). A remissão completa é obtida em mais de 90% dos cães tratados e os animais normalmente permanecem livres da doença (JOHNSON, 1994). O TVT também é sensível à imunoterapia, radioterapia e homeopatia. Também é tratado cirurgicamente. Cada método tem suas vantagens e desvantagens, cabendo então ao clínico a escolha da melhor opção de tratamento após análise criteriosa do caso.

## **1.2 Autohemoterapia**

A autohemoterapia é uma técnica antiga empregada em vários tipos de doenças sistêmicas e de origem desconhecida. Na literatura, observa-se que a técnica foi usada em humanos para o tratamento de diversas enfermidades infecciosas, em particular, na febre tifóide e em diversas dermatoses.

Os efeitos benéficos da autohemoterapia são atribuídos ao estímulo do sistema fagocítico mononuclear (SFM). Investigações antigas fornecem bases fundamentadas para estes efeitos. Um método simples foi utilizado para testar os efeitos do estímulo promovido pela autohemoterapia. Uma substância irritante, a cantárida, foi inoculada na coxa de pacientes por 24 horas. Após a formação de uma vesícula, o fluido foi retirado, centrifugado e o sedimento embalado a vácuo para a contagem de leucócitos. Após a contagem foi obtida uma percentagem de 5% de monócitos. A percentagem foi elevada após a autohemoterapia a partir da primeira hora chegando, após 8 horas, a 22%, sendo que 20% ainda se encontravam presentes após um período de 72 horas. A quantidade de monócitos decresceu gradualmente no período de sete dias (SCHÜRER-WALDHEIM, 1933).

Com os excelentes resultados obtidos com a técnica no tratamento de pneumonias pós-operatórias, a autohemoterapia foi utilizada como método profilático, em 300 casos de pacientes humanos em uma clínica particular. Nestes pacientes, não ocorreram complicações pulmonares, a não ser pequena área trombótica em um pulmão, cinco dias após a operação. Concluiu-se que a autohemoterapia também tem efeito estimulante sobre o sistema simpático, aumentando a atividade e resistência dos tecidos (METTENLEITER, 1936).

No Brasil, foi realizado um trabalho semelhante em contribuição ao estudo das complicações pulmonares pós-operatórias em humanos, principalmente no que se refere à sua profilaxia utilizando-se a autohemoterapia. O trabalho reuniu 150 casos atendidos no Hospital

Geral da Santa Casa da Misericórdia do Rio de Janeiro. Nos 150 casos estudados não surgiram complicações infecciosas. Em vários casos em que se deixou de fazer a autohemoterapia, a título de contraprova, as complicações infecciosas apareceram, sendo tratadas pela autohemoterapia em altas doses (40 a 80 ml), conseguindo-se cura das complicações (TEIXEIRA, 1940).

Em uma análise de dados experimentais e clínicos do efeito estimulante da autohemoterapia em humanos e animais, bem como experimentos *in vitro* com linfócitos, foi observado que os produtos da degradação eritrocitária exercem um efeito mais poderoso que eritrócitos intactos. O efeito estimulante da autohemoterapia manifestou um aumento da resistência à infecção, aumento da produção de anticorpos contra microorganismos e antígenos teciduais e ativação do funcionamento dos mecanismos de defesa mediados por células. A autohemoterapia estimula a eritropoiese e ativa o sistema imune, permitindo a manutenção da homeostasia (KLEMPARSKAYA et al., 1986) e, o mais importante, não apresenta efeitos colaterais (KLEMPARSKAYA et al., 1986; OLWIN; RATAJCZAK; HOUSE, 1997).

A autohemoterapia foi utilizada para o tratamento de 68 homens e 16 mulheres com papilomas venéreos tratados previamente com *podophyllin*, crioterapia, eletrocauterização e incisão cirúrgica, sem sucesso. O tratamento consistiu da administração de 5-10 ml de sangue venoso na região glútea dos pacientes, com repetição semanal (3 a 10 aplicações). Neste estudo clínico, foram completamente curados 36,9% dos pacientes. Houve melhora em 28% dos homens e recidiva em 2,75% dos pacientes. Mulheres com papilomas no colo do útero ou face interna das coxas não melhoraram, mas todas as mulheres com papilomas na vagina ou no meato urinário foram curadas (WILLIAMS et al., 1990).

A autohemoterapia também foi utilizada com sucesso no tratamento do herpes zoster, a qual é uma doença viral que afeta um número significativo de indivíduos. Atualmente não existe tratamento satisfatório disponível para a enfermidade. Pacientes humanos tratados com a técnica apresentaram alívio da dor e desaparecimento das lesões. Nestes casos, não ocorreram recidivas. Sangue desses pacientes foi coletado antes e após a autohemoterapia para dosagem de várias citocinas. Foi observado que a quantidade de interleucina-4, interferon- $\alpha$  e  $\gamma$  aumentou nos pacientes 24 horas após a autohemoterapia. Os dados indicaram que a autohemoterapia é efetiva no tratamento de herpes zoster em seres humanos e que interferon e interleucina-4 podem estar envolvidos na eliminação dos sintomas (OLWIN; RATAJCZAK; HOUSE, 1997).

A angiodermatite necrótica é uma doença de seres humanos caracterizada pela presença de úlceras muito dolorosas na pele, de disseminação rápida e de demorada cicatrização (4 a 11 meses). O tratamento é difícil e pouco satisfatório, por isso foi testado um tratamento alternativo, a autohemoterapia, em 11 pacientes, com aplicações três vezes por semana durante um mês. Os

critérios avaliados foram: evolução da dor, superfície da úlcera, escala calorimétrica e data de desaparecimento do halo roxo. Dez pacientes tiveram alívio da dor, com progressiva retirada dos analgésicos. A progressão da lesão parou e o halo roxo desapareceu, em geral, no sexto dia com variação de 2 a 21 dias. A percentagem do tecido de granulação considerando-se a superfície da úlcera foi de 45% no dia zero, 80% no 14<sup>a</sup> dia e 85% no 28<sup>a</sup> dia concluindo-se que a autohemoterapia aplicada durante a fase inicial reduz a dor e prepara a lesão para um enxerto de pele (COURIVAUD et al., 2005).

A efetividade da técnica foi demonstrada também para o tratamento de outras lesões de pele, como a esclerodermia, numa mulher de 48 anos. Ela era portadora de extensas feridas com predominância de tecido necrótico, envolvendo os membros inferiores dos joelhos para baixo e, ainda, outra ferida com cratera profunda na mama direita. O tratamento foi realizado durante quatro meses com aplicações de 20 ml de sangue nas 12 primeiras semanas e 10 ml da 13<sup>a</sup> semana em diante. Ao final do tratamento a paciente apresentou melhora acentuada do quadro clínico, com remissão dos sintomas e granulação de 70% da área afetada, enquanto que a ferida da mama cicatrizou totalmente (GEOVANINI; NORBERTO, 2006).

Essa técnica também é muito empregada no tratamento da papilomatose cutânea bovina. A papilomatose é uma enfermidade infectocontagiosa, viral, de caráter tumoral benigno, caracterizando-se por tumores localizados na pele e na mucosa oral. Estudos clínicos demonstram cura dos animais com papilomatose bovina tratados com autohemoterapia (SANTIN; BRITO, 2004; SILVA et al., 2004). Há relato também do tratamento de papilomatose canina com associação de autohemoterapia e clorobutanol. Houve desaparecimento de 60% dos nódulos papilomatosos presentes na região bucal do animal. A terapia foi instituída aplicando por via intramuscular, uma vez por semana, durante 15 dias, 3 ml do soro do cão e clorobutanol (30 mg/kg), a cada três dias, durante nove dias (CESARINO et al., 2008).

A autohemoterapia também pode ser empregada em associação com o ozônio, que é utilizado de forma tópica e sistêmica. Esse protocolo de tratamento foi usado com sucesso numa égua com uma ferida rostral extensa localizada no antímero direito entre o olho e narina, com suspeita clínica de habronemose cutânea. O tratamento sistêmico consistiu de autohemoterapia ozonizada por meio de duas aplicações por semana durante dois meses. O sangue foi obtido via punção da veia jugular e recolhido em bolsa de transfusão de sangue. Após introdução do ozônio o sangue ozonizado foi transfundido ao animal pela mesma via. O tratamento tópico da lesão foi feito diariamente com duas aplicações na lesão de água e óleo ozonizados durante dois meses. Não ocorreram manifestações de dor, efeitos colaterais indesejáveis ou intolerância ao ozônio no decorrer do tratamento. Observou-se gradativa formação de tecido de cicatrização em

substituição à pele necrosada, com rápida redução da área afetada e decorridos dois meses de tratamento, a regeneração tecidual e cicatrização de quase toda a superfície lesada apontaram para a cura clínica do animal (GARCIA et al., 2008).

Atualmente a utilização da autohemoterapia é muito polêmica. Por se tratar de uma terapia alternativa, alguns profissionais da área de saúde não a reconhecem, nem a validam por não acreditarem em suas vantagens, o que a torna pouco divulgada no meio científico e entre a população em geral (SILVA, 2006).

Ainda existe pouca literatura sobre o modo de ação da autohemoterapia e os trabalhos existentes são muito antigos. A maioria dos registros encontrados relata a eficácia da técnica para uma grande variedade de doenças, principalmente humanas, por meio de depoimentos de pacientes que utilizaram esse método de tratamento ou mesmo por meio de experiências realizadas por profissionais da saúde humana (SILVA, 2006) e veterinária (SANTIN; BRITO, 2004; SILVA et al., 2004; CESARINO et al., 2008). No entanto, a maioria dos relatos carece de base científica. Embora a autohemoterapia tenha sido documentada e popularizada durante a primeira metade do século 20, são muito escassos os trabalhos controlados e com metodologia adequada sobre a técnica. Hoje, essa prática foi proibida no Brasil para uso em seres humanos, sob a alegação de falta de comprovações científicas. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu que médicos humanos prescrevessem esse método de tratamento.

No entanto, há quem defenda a técnica, ressaltando que a autohemoterapia é um recurso terapêutico de baixo custo e simples e que por seus benefícios, deveria ser mais divulgada entre os profissionais de saúde (SILVA, 2006).

A dissertação apresenta um capítulo que foi escrito nas normas da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, A.S. et al. 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.

ANDRADE, S.F. et al. Normas de segurança para o uso de vincristina no tratamento de tumor venéreo transmissível em cães. **Clínica Veterinária**, v.4, n.18, p.32-33, 1999.

BATAMUZI E.K.; KRISTENSEN, F. Urinary tract infection: the role of canine transmissible venereal tumour. **The Journal of Small Animal Practice**, v.37, n.6, p.276-279, 1996.

BATISTA, J.S. et al. Tumor venéreo transmissível canino com localização intra-ocular e metástase no baço. **Acta Veterinaria Brasília**, v.1, n.1, p.45-48, 2007.

BENTUBO, H.D.L. et al. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1021-1026, 2007.

CATONE, G. et al. Canine transmissible venereal tumor parasitized by *Leishmania infantum*. **Veterinary Research Communications**, v.27, n.7, p.549-553, 2003.

CESARINO, M. et al. Efeito da autohemoterapia associada com clorabutanol no tratamento da papilomatose oral em cão (*Canis familiaris*) – Relato de caso. In: SEMANA CIENTÍFICA DE MEDICINA VETERINÁRIA DE UBERLÂNDIA, 20., 2008, Uberlândia.

**Resumos...**Uberlândia: Universidade federal de Uberlândia, 2008. p.62. Disponível em: [http://www.famev.ufu.br/documentos/anais\\_secivet\\_2008.pdf](http://www.famev.ufu.br/documentos/anais_secivet_2008.pdf). Acesso em 20 dez. 2008.

COURIVAUD, D. Autohémothérapie locale dans l'angiodermite nécrotique: étude pilote. **Annales de dermatologie et de venerologie**, v.132, n.3, p.225-229, 2005.

DE NARDI, A.B. et al. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da universidade federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.15-26, 2002.

GARCIA, C.A. et al. Autohemoterapia maior ozonizada no tratamento de habronemose em equino – relato de caso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. **Resumos...**Gramado: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2008. 1 CD-ROM.

GEOVANINI, T.; NORBERTO, M.M.C. Tratamento de feridas através da autohemoterapia: um estudo de caso clínico. **Universidade Presidente Antônio Carlos de Juiz de Fora**, 2006.

Disponível em:

[www.geocities.com/autohemoterapiabr/TRATAMENTO\\_DE\\_FERIDAS\\_AUTOHEMOTERAPIA\\_Prof\\_Telma.pdf](http://www.geocities.com/autohemoterapiabr/TRATAMENTO_DE_FERIDAS_AUTOHEMOTERAPIA_Prof_Telma.pdf) Acesso em 2 set. 2008.

GONZALEZ, C. M. et al. Canine transmissible venereal tumour: a morphological and immunohistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regression after chemotherapy. **Journal of Comparative Pathology**, v.122, p.241-248, 2000.

HSIAO, Y. et al. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.87, n.1, p.19-27, 2002.

JOHNSON, C.A. Infecções genitais e tumor venéreo transmissível. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Fundamentos de medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1994. Cap.62, p.522-525.

KLEMPARSKAYA, N.N. et al. Immunomodulating effect of autohaemotherapy (a literature review). **Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology**, v.30, n.3, p.331-336, 1986.

LIAO, K. et al. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.92, n.3-4, p.149-162, 2003.

MARCHAL, T. et al. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 57, n.1-2, p.1-11, 1997.

MARTÍNEZ, M.M.; BALLUT, J.C.; CARDONA, J.A. Tumor venéreo transmissível (TVT) de localização extragenital. **MVZ-Córdoba**, v.7, n.1, p.168-170, 2002.

METTENLEITER, M.W. Autohemotransfusion in preventing postoperative lung complications. **American Journal of Surgery**, v.32, n.2, p.321-323, 1936.

MOZOS, E. et al. Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumor. **Veterinary Pathology**, v.33, n.3, p.257-263, 1996.

MYLONAKIS, M.E et al. A retrospective study of 61 cases of spontaneous canine epistaxis (1998 to 2001). **Journal of Small Animal Practice**, v.49, n.4, p.191-196, 2008.

NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. Patologias da cérvix, da vagina e da vulva. In: \_\_\_\_\_. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p.75-78.

O'KEEFE, D.A. Tumores do sistema genital e das glândulas mamárias. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole LTDA, 1997, p.2344-2351.

OLWIN, J.H.; RATAJCZAK, H.V.; HOUSE, R.V. Successful treatment of herpetic infections by autohemotherapy. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.3, n.2, p.155-158, 1997.

PARK, M. et al. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, n.1, p.130-133, 2006.

PÉREZ, J.; DAY, M.J.; MOZOS, E. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.64 p.133-147, 1998.

PIRES, M.A. et al. Neoplasias em canídeos - um estudo descritivo de 6 anos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, n. 98, v.547, p.111-118, 2003.

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.

SANTOS, F.G.A. **Morfologia, morfometria e imuno-histoquímica das fases de crescimento e regressão espontânea do tumor venéreo transmissível canino**. 2002. 81 f. Tese (Doutorado em Patologia e Ciências Clínicas) – Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

SANTOS, F.G.A. et al. O tumor venéreo transmissível canino – aspectos gerais e abordagens moleculares (revisão de literatura). **Bioscience Journal**, v.21, n.3, p.41-53, 2005.

SANTIN, A.P.I.; BRITO, L.A.B. Estudo da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros: comparação de diferentes tratamentos. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.1, p.39-45, 2004.

SILVA, L.A.F. et al. Eficiência da repetição de diferentes protocolos de tratamentos para papilomatose bovina. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.11, n.1, p. 153-165, 2004.

SILVA, M.C.S. **Autohemoterapia**. 2006. 96f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Enfermagem), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Presidente Antônio Carlos, Juiz de Fora, 2006.

SILVA, M.C.V. et al. Avaliação epidemiológica, diagnóstica e terapêutica do tumor venéreo transmissível (TVT) na população canina atendida no hospital veterinário da UFERSA. **Acta Veterinaria Brasílica**, v.1, n.1, p.28-32, 2007.

SOUSA, J. et al. Características e incidência do tumor venéreo transmissível (TVT) em cães e eficiência da quimioterapia e outros tratamentos. **Archives of Veterinary Science**, v.5, p.41-48, 2000.

SCHÜRER-WALDHEIM, F. Über die Wirkungsweise der Eigenblutbehandlung. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v.239, n.11-12, p.352-362, 1933.

TEIXEIRA, J. Complicações pulmonares pós-operatórias. **Revista Brasil-Cirúrgico**, v.2, n.3, p.213-230, 1940.

VARASCHIN, M.S. et al. Tumor venéreo transmissível canino na região de Alfenas, Minas Gerais: formas de apresentação clínico-patológicas. **Revista Clínica Veterinária**, v.32, p.40- 48, 2001.

WILLIAMS, J. et al. Autohaemotherapy for genital, anal and perianal warts. **Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases**, v.11, n.2, p.57-58, 1990.

## 2 CAPÍTULO

### **Autohemoterapia, vincristina e associação dos dois tratamentos no tumor venéreo transmissível canino**

Karina O. Drumond<sup>1\*</sup>, Ana M. Quessada<sup>2</sup>, Silvana M.M.S. Silva<sup>2</sup>, Francisco A.L. Costa<sup>2</sup>,  
Lucilene S. Silva<sup>1</sup>, Flaviane A. Pinho<sup>1</sup>, Rallyson R.F.B. Lopes<sup>3</sup> e Larissa M.F. Gonçalves<sup>1</sup>

**ABSTRACT.**- Drumond K.O., Quessada A.M., Silva S.M.M.S., Costa F.A.L., Silva L.S., Pinho F.A., Lopes R.R.F.B. & Gonçalves L.M.F. 2009. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Campus Agrícola da Socopo, s/n. Teresina, PI 64049-550 Brazil. E-mail: [karinadrumond@gmail.com](mailto:karinadrumond@gmail.com)

The purpose of this study was to evaluate the behavior of the canine transmissible venereal tumor with natural occurrence after treatment with autohemotherapy compared to treatment with vincristine and association of the two treatment methods. Eighteen bitches, adult, were used, randomly divided into three equal groups (n = 6). The bitches in Group 1 (G1) were treated with vincristine (0.025mg/kg once per week, maximum of seven applications). In group 2 (G2), the bitches were treated with autohemotherapy (5.0 or 10.0 ml once a week, seven applications). In group 3 (G3) were treated with combination of vincristine (0.025mg/kg) and autohemotherapy (5.0 or 10.0 ml) once a week, with a maximum of seven applications. Macroscopic evaluation (measurement of the tumoral mass), microscopic (cytologic, histopathological, immunohistochemistry with Ki-67 and apoptosis),

---

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de Sanidade e Reprodução Animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI). Campus Agrícola da Socopo, s/n. Teresina, PI 64049-550, Brasil. \*Autor para correspondência: [karinadrumond@gmail.com](mailto:karinadrumond@gmail.com).

<sup>2</sup> Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, UFPI. Campus Agrícola da Socopo, s/n. Teresina, PI 64049-550.

<sup>3</sup> Aluno de Graduação do curso de Medicina Veterinária, Hospital Veterinário Universitário, UFPI. Campus Agrícola da Socopo, s/n. Teresina, PI 64049-550.

hematological and biochemical profile were made. The regression of tumor mass was observed in a significant way only in G1 ( $p > 0,0001$ ) and G3 ( $p > 0,0001$ ), with no difference in G2 ( $p = 0,853$ ) were detected between before and after treatment, although the tumor regression occurred in three animals of G2. There was no significant difference ( $p = 0,5732$ ) in the counting of cell proliferation between animals from G1 and G3, but there was no significant difference ( $p = 0,00549$ ) between the G2 and bitches of the other groups. The counting of cell proliferation decreased and reached zero in the course of treatment (G1 and G3). The number of apoptotic cells did not differ significantly between the three groups, but occurred increase not significant of these cells after treatment in the animals of G1 and G3. The same was not observed in G2. Side effects were observed (apathy, inappetence, alopecia, vomiting and diarrhea) in some animals of G1 and G3 and were attributed to chemotherapy. The vincristine also cause hematological abnormalities (anemia, leukopenia and thrombocytopenia or thrombocytosis) in G1 and G3, but did not cause biochemical changes. The treated animals with autochemotherapy did not present side effect. It was concluded that the macroscopic autochemotherapy promoted partial regression of tumor mass in 50% of animals undergoing this treatment. Thus, further research in this area are necessary to better elucidate this inquiry.

**INDEX TERMS:** Genital system, neoplasia, therapy, dog.

**RESUMO.-** A proposta desse trabalho foi avaliar o comportamento do tumor venéreo transmissível de ocorrência natural após o tratamento com autohemoterapia em comparação ao tratamento com vincristina e associação dos dois métodos terapêuticos. Foram utilizadas 18 cadelas, adultas, divididas aleatoriamente em três grupos iguais. As cadelas do grupo 1 (G1) foram tratadas com vincristina (0,025mg/kg, uma vez por semana, máximo de sete aplicações). No grupo 2 (G2) as cadelas foram tratadas com autohemoterapia (5,0 ou 10,0 ml,

uma vez por semana, sete aplicações). No grupo 3 (G3) foram tratadas com associação de vincristina (0,025mg/kg) e autohemoterapia (5,0 ou 10,0 ml) uma vez por semana, com o máximo de sete aplicações. Avaliações macroscópicas (mensuração da massa tumoral), microscópicas (citológico, histopatológico, imunohistoquímica com Ki-67 e detecção de apoptose), hematológicas e bioquímicas foram realizadas. A regressão da massa tumoral foi observada de forma significativa apenas no G1 ( $p > 0,0001$ ) e G3 ( $p > 0,0001$ ), não havendo diferença no G2 ( $p = 0,853$ ) antes e após o tratamento, embora tenha sido observada regressão da massa tumoral em três animais do G2. Não houve diferença significativa ( $p = 0,5732$ ) na contagem de células em proliferação entre os animais do G1 e G3, porém houve diferença significativa ( $p = 0,00549$ ) entre os animais do G2 e os demais grupos. A contagem de células em proliferação diminuiu e chegou a zero no decorrer do tratamento (G1 e G3). A contagem de células apoptóticas não diferiu de forma significativa entre os três grupos, mas após o tratamento houve aumento dessas células nos animais do G1 e G3. O mesmo não foi observado no G2. Ocorreram efeitos colaterais (apatia, inapetência, alopecia, vômito e diarreia) em alguns animais do G1 e G3, atribuídos à quimioterapia. A vincristina também provocou alterações hematológicas (anemia, trombocitopenia ou trombocitose e leucopenia) no G1 e G3, mas não provocou alterações bioquímicas. Os animais tratados com a autohemoterapia não apresentaram efeito colateral. Concluiu-se que a autohemoterapia promoveu regressão macroscópica parcial da massa tumoral em 50% dos animais submetidos a esse tratamento, o que vem estimular o aprofundamento de pesquisas nesta área.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Sistema genital, neoplasia, cão, terapia.

## 2.1 INTRODUÇÃO

O tumor venéreo transmissível (TVT) canino é uma neoplasia contagiosa de células redondas, que afeta principalmente as superfícies mucosas da genitália externa de cães de ambos os sexos (Johnson 1994). É transmitido pelo contato das células tumorais vivas com as membranas mucosas ou com as superfícies onde a pele esteja escarificada ou que apresente solução de continuidade (O'Keefe 1997, Martinez et al. 2002). A transmissão venérea é a mais comum (Johnson 1994), embora o TVT possa ser transplantado para outros locais anatômicos (mucosas oral, ocular, nasal e anal) por meio dos atos de lambar, arranhar, morder e farejar (Johnson 1994; O'Keefe 1997).

O TVT, tanto de ocorrência natural quanto experimental, cresce rapidamente (fase progressiva) após a transplantação; é seguido de uma fase estática (em que não há proliferação celular) e, então, regride espontaneamente (fase de regressão) em animais imunocompetentes (Chandler & Yang 1981).

A fase progressiva é caracterizada por intensa proliferação das células tumorais (Gonzalez et al. 2000) e por supressão da resposta imune humoral e celular do hospedeiro. As células tumorais conseguem diminuir a proporção de linfócitos B no sangue periférico. Essa diminuição foi atribuída a uma (ou mais) substância citotóxica seletiva secretada pelas células do TVT que destrói as células de defesa (Liao et al. 2003). O infiltrado de linfócitos T e macrófagos também diminui nessa fase do crescimento (Pérez et al. 1998).

A regressão da neoplasia está associada com aumento do infiltrado de linfócitos T e macrófagos no tumor (Pérez et al. 1998) e caracterizada por aumento de apoptose das células tumorais e fibrose (Gonzalez et al. 2000). Outros fatores, como expressão de antígenos do complexo de histocompatibilidade principal de classe I e II (MHC I e II) em células de TVT, liberação de citocinas por células inflamatórias (Chu et al. 2001), imunidade humoral (Liao et al. 2003) e necrose (Santos et al. 2005) podem contribuir para a regressão tumoral.

Essas fases podem ser caracterizadas por meio de técnicas laboratoriais que utilizam marcadores de proliferação celular para caracterizar a fase progressiva do tumor (Marchal et al. 1997, Perez et al. 1998, Gonzalez et al. 2000, Hsiao et al. 2002; Liao et al. 2003, Park et al. 2006) e estática (Chandler & Yang 1981) e marcadores de morte celular para caracterizar a fase de regressão da neoplasia (Gonzalez et al. 2000, Santos 2002).

O diagnóstico clínico do TVT é geralmente feito pelo aspecto físico do tumor localizado na genitália externa. Porém a confirmação diagnóstica é realizada por meio de citologia esfoliativa (“imprints”), aspiração por agulha fina ou histopatologia (Magalhães et al. 2001).

O TVT é sensível a diversos agentes quimioterápicos. Dentre esses, a vincristina tem sido uma das drogas mais utilizadas pelos clínicos veterinários. Outras formas terapêuticas já foram investigadas como a doxorrubicina (Sousa et al. 2000), ciclofosfamida (Ramos et al. 2006), Thuya (Manhoso 1997), *Viscum album* (Lefebvre et al. 2007) e *Syphonosporinum* (Soares 2007), cada uma com variados graus de resposta. A vincristina além de promover efeitos colaterais (Oliveira 2005) e exigir cuidados em sua aplicação (Andrade et al. 1999), tem um custo relativamente alto, impossibilitando a compra por proprietários com menor poder aquisitivo. Com isso, novas alternativas terapêuticas de baixo custo são sugeridas, como é o caso da autohemoterapia.

Essa técnica é muito antiga e vem sendo empregada no tratamento de vários tipos de doenças humanas e animais. Na clínica veterinária já foi utilizada com sucesso no tratamento da papilomatose canina (Cesarino et al. 2008) e bovina (Santin & Brito 2004; Silva et al. 2004), habronemose cutânea eqüina (Garcia et al. 2008), sarcóide eqüino (Verçosa et al. 2007) e ectima contagioso em ovinos (Veríssimo & Katiki 2008). Essa técnica tem eficácia comprovada por estudos laboratoriais que demonstram o efetivo crescimento do número de

macrófagos celulares, o que induz a um aumento da imunidade orgânica (Schurer-Waldheim 1933).

Esse trabalho objetivou avaliar o comportamento do tumor venéreo transmissível em cadelas com tumor transplantado naturalmente, após o tratamento com autohemoterapia em comparação ao tratamento com vincristina e associação dos dois métodos terapêuticos.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia adotada durante o desenvolvimento do presente trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI (Anexo).

### **Animais**

Foram utilizadas 18 cadelas adultas, pesando de 4,0 a 12,0 kg, com TVT genital (n = 17) e extragenital (região inguinal direita) (n = 1) de ocorrência natural, provenientes do Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal do Piauí e da Gerência de Zoonoses (GEZOON) de Teresina (PI). Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos de seis animais. O grupo 1 (G1) foi formado por cadelas submetidas ao tratamento com sulfato de vincristina<sup>4</sup> na dose de 0,025mg/kg, por via endovenosa, uma vez por semana, até a regressão completa da neoplasia ou até o máximo de sete aplicações (Rosenthal 1997). O grupo 2 (G2) foi composto por animais submetidos ao tratamento com autohemoterapia. Essa técnica constou da aplicação de sangue total (retirado da veia jugular) nos músculos glúteos, na dose de 5,0 ou 10,0 ml, dependendo do porte do animal (para cães até 5,0 kg utilizou-se 5,0 ml, para cães acima deste peso, 10,0 ml). As aplicações foram feitas semanalmente, durante sete semanas. O grupo 3 (G3) foi constituído por animais tratados com a associação

---

<sup>4</sup> Tecnocris: Zodiac, São Paulo.

de sulfato de vincristina (0,025mg/kg, via endovenosa) e autohemoterapia (5,0 ou 10,0 ml) uma vez por semana, até a regressão completa da neoplasia ou até o máximo de sete aplicações.

Para confirmação diagnóstica da neoplasia foram realizados exame citológico e histopatológico. Os cães com diagnóstico confirmado foram avaliados quanto ao estado geral por meio de exame físico e laboratorial (hemograma e bioquímica sérica – uréia, creatinina, proteína total, albumina e globulina) e os dados anotados em fichas individuais. Todos os exames foram feitos antes, durante e uma semana após o término do tratamento, em todos os grupos. Os tumores foram medidos para observação da regressão utilizando-se um paquímetro. Antes do tratamento os animais foram vermifugados<sup>5</sup>. As cadelas provenientes do GEZON foram alojadas em canis e passaram por uma semana de adaptação antes do início do tratamento. Foram alimentadas com ração comercial para cães adultos.

### **Citologia aspirativa por agulha fina**

Para confirmação do TVT foi realizada aspiração de células tumorais, utilizando-se agulha 21G acoplada a uma seringa de 10,0 ml. Para colheita, as cadelas foram contidas manualmente e colocadas em decúbito lateral. A massa tumoral foi exposta, lavada com solução fisiológica e desinfetada com álcool-iodado. O material colhido foi transferido para lâminas de microscopia, foram preparados quatro esfregaços, fixados em álcool metílico e corados com Giemsa. A leitura foi realizada em microscópio de luz na objetiva de imersão (100x). As lâminas foram consideradas diagnósticas para TVT quando apresentaram os seguintes tipos celulares: células grandes e arredondadas, com padrão quase epitelial, contendo núcleo redondo único arroxeadado e excêntrico, com pequena proporção

---

<sup>5</sup> Dipilex plus: Univet, São Paulo.

núcleo:citoplasma; citoplasma levemente corado ou sem cor, finamente granular e com vacúolos claros bem definidos; nucléolo localizado centralmente (Santos 2002).

### **Histopatologia**

Na colheita de material para histopatologia, todas as cadelas também foram contidas manualmente e colocadas em decúbito lateral e a massa tumoral foi exposta. Para colheita dos fragmentos foi realizada anestesia local com cloridrato de lidocaína<sup>6</sup>. As amostras foram coletadas com bisturi comum, tomando-se o cuidado de se incluir tecido sadio nas bordas para comparação histológica. Os fragmentos de aproximadamente 0,5 cm foram fixados em formol tamponado com fosfato 0,01M pH 7,4 a 10%, desidratados em soluções crescentes de álcool, diafanizados em xilol, incluídos em parafina, cortados a 5,0 µm de espessura e corados em H-E (Prophet et al. 1992). Secções também foram submetidas à técnica de imunoperoxidase.

### **Imunohistoquímica**

As lâminas contendo tecidos de todas as fases do tratamento foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em soluções decrescentes de álcool. Posteriormente foi realizado desmascaramento de antígeno em tampão citrato pH 6,0, por 10 e 5 minutos, em forno microondas<sup>7</sup>, potência máxima. Em seguida as lâminas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS). O bloqueio da peroxidase endógena (incubação por 5 minutos) foi realizado com *peroxidase block* presente no kit comercial LSAB 2 System-HRP<sup>8</sup>, de acordo com as instruções do fabricante. As lâminas foram incubadas com o anticorpo monoclonal Ki-67, clone M1B-1<sup>9</sup>, na diluição de 1:40, em atmosfera úmida, à temperatura ambiente, por 10 minutos. Após lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas com um

---

<sup>6</sup> Cloridrato de lidocaína 2%: Hipolabor, Minas Gerais.

<sup>7</sup> Jetdefrost: Brastemp, São Paulo.

<sup>8</sup> LSAB 2 System-HRP: Dako Corporation.

<sup>9</sup> Monoclonal mouse anti-human KI-67: Dako Corporation.

anticorpo secundário biotinizado, de acordo com as instruções do fabricante (Guvenc et al. 2002). Posteriormente, foram feitas lavagens em PBS e as lâminas foram incubadas com estreptavidina, em atmosfera úmida, à temperatura ambiente, por 10 minutos. Foram novamente lavadas em PBS e incubadas com uma solução contendo uma gota de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) diluída em 1,0 ml de substrato cromógeno, por 5 minutos. As lâminas foram lavadas em PBS e água destilada e contracoradas com hematoxilina de Harrys. Após montagem foi realizada a contagem de células em proliferação por campo (20 campos aleatórios) utilizando o analisador de imagem computadorizado Leica Qwin D-1000, versão 4.1<sup>10</sup>, do Setor de Patologia Animal, do CCA/UFPI. Foram consideradas positivas as células com a característica coloração marrom, enquanto as células negativas mostravam núcleo de cor azulada (Greatti et al. 2004).

### **Apoptose**

A técnica para detecção de apoptose foi realizada utilizando-se o kit comercial, ApopTag Peroxidase *in situ*<sup>11</sup>, seguindo as instruções do fabricante. As lâminas foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em soluções decrescentes de álcool. Após lavagem em PBS as lâminas foram incubadas com proteinase K<sup>12</sup> (20µg/ml), durante 15 minutos, em temperatura ambiente. Após lavagem com água deionizada foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 0,03% diluído em metanol, por 5 minutos, em temperatura ambiente. Após lavagem em PBS foi aplicado o *equilibration buffer* diretamente no corte, por 10 segundos, em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas em atmosfera úmida, 37°C, por uma hora, com uma solução contendo 30% da enzima *terminal deoxinucleotidil transferase* diluída em 70% de *reaction buffer*. Posteriormente as lâminas foram incubadas com uma solução de parada de reação (1,0 ml de *stop/wash buffer*

---

<sup>10</sup> Leica Qwin D-1000, versão 4.1: Cambridge, UK.

<sup>11</sup> ApopTag peroxidase *in situ*: Chemicon International, Califórnia.

<sup>12</sup> Proteinase K: Invitrogen Life Technologies, Califórnia.

diluído em 34,0 ml de água deionizada), por 10 minutos, em temperatura ambiente. Após lavagem em PBS foi aplicado o conjugado anti-digoxigenina, em atmosfera úmida, por 30 minutos, 37°C. Foram feitas lavagens novamente em PBS e, em seguida, as lâminas foram incubadas com uma solução contendo 0,3 mg/ml de DAB<sup>13</sup> e 0,06% de peróxido de hidrogênio diluídos em PBS, durante 6 minutos. Após contracoloração com hematoxilina de Harrys e montagem, foi feita a contagem de células em apoptose por campo (20 campos aleatórios) no analisador de imagem computadorizado Leica Qwin D-1000, versão 4.1, do Setor de Patologia Animal, do CCA/UFPI. Foram consideradas positivas aquelas células com a característica coloração marrom, que apresentavam núcleos condensados, com retração citoplasmática e halos claros (Santos et al. 2001).

### **Análise estatística**

Os resultados quantitativos foram analisados no programa estatístico Sigma Stat, utilizando-se testes não paramétricos: a) método de Kruskal-Wallis para análise de variância. Havendo diferença significativa, aplicou-se o teste de Dunn ou Student-Newman-Keuls para comparação múltipla de grupos; b) método de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos. Adotou-se o nível de significância de  $p < 0,05$ .

## **2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Aspectos Macroscópicos**

Todos os tumores, independentemente do tamanho, eram friáveis e sangravam com facilidade. Variaram em relação à forma e tamanho. Havia tumores multilobulados, nodulares e em forma de couve-flor, de coloração róseo-pálida à avermelhada, com superfície lisa ou

---

<sup>13</sup> DAB: Sigma Chemical, USA.

irregular, com ou sem lobulação (Fig.1). Em alguns havia sinais de infecção secundária caracterizados pela presença de secreção purulenta e serosangüinolenta. Durante o exame físico, uma (5,55%) cadela do G3 apresentou metástase no linfonodo inguinal esquerdo (Anexo) confirmada pelo exame citológico.

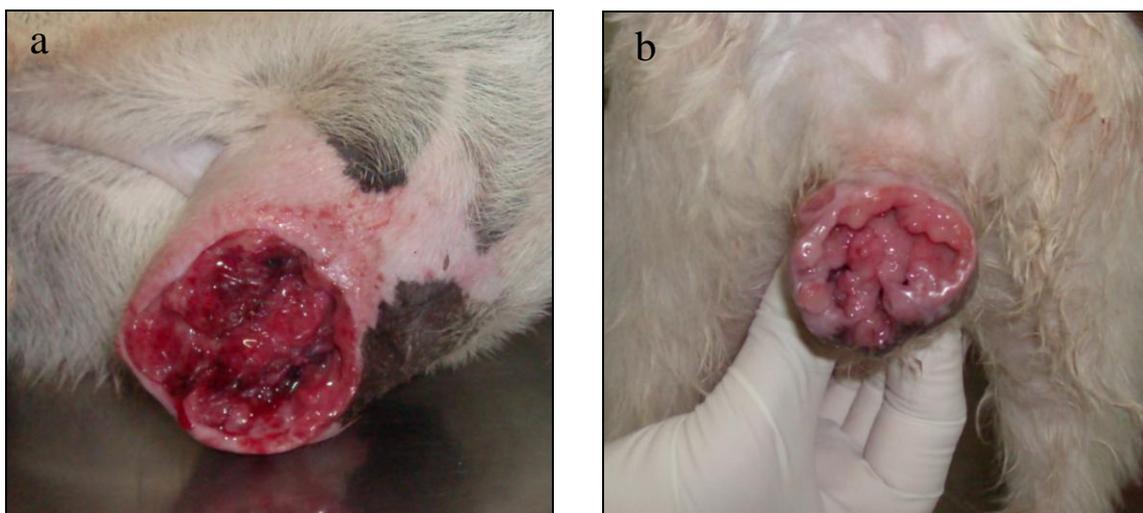


Fig.1. Tumor venéreo transmissível em cadelas, sem raça definida, adultas, antes do tratamento; (a e b) notar massa tumoral de aspecto multilobulado, de coloração avermelhada e superfície irregular.

De forma geral a mensuração da massa tumoral variou de 2,1 cm a 7,1 cm. Houve diferença entre os três grupos ( $p = 0,00247$ ), sendo que a regressão da massa tumoral foi significativamente maior nas cadelas do G1 ( $p < 0,0001$ ) e G3 ( $p < 0,0001$ ) (Fig.2 e 3, respectivamente). Nas cadelas do G2 não houve regressão significativa da massa tumoral ( $p = 0,856$ ) antes e após o tratamento com autohemoterapia (Fig.4). Na maioria das cadelas dos outros dois grupos, as massas tumorais foram diminuindo até que não fosse mais possível mensurá-las.

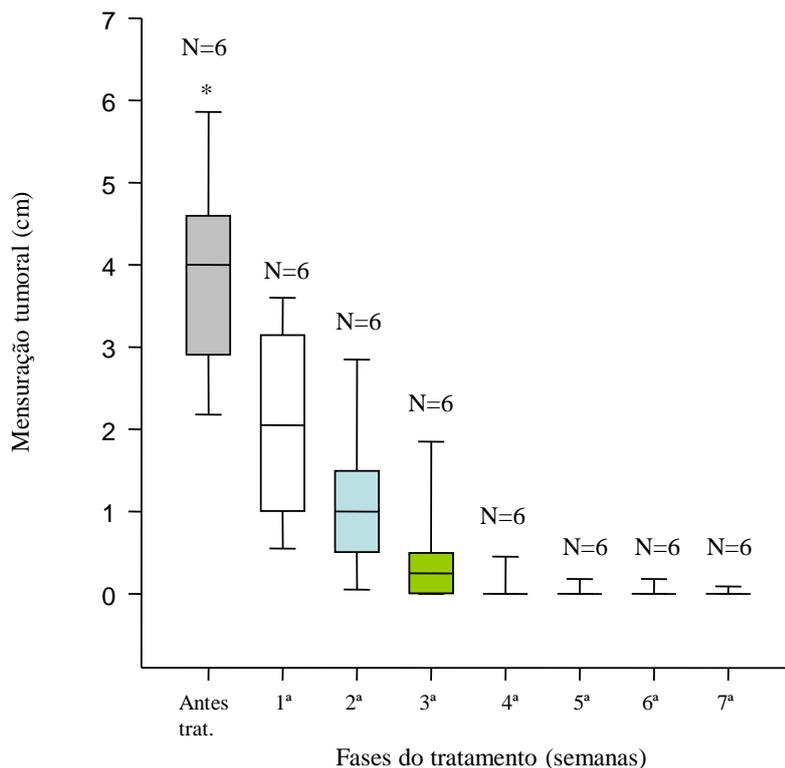


Fig.2. Mensuração tumoral em cadelas com tumor venéreo transmissível (mediana e intervalo em percentis 25 e 75) antes e após tratamento com vincristina. N = número de animais por grupo. \*( $p < 0,0001$ ) (teste de Kruskal Wallis e Student-Newman-Keuls).

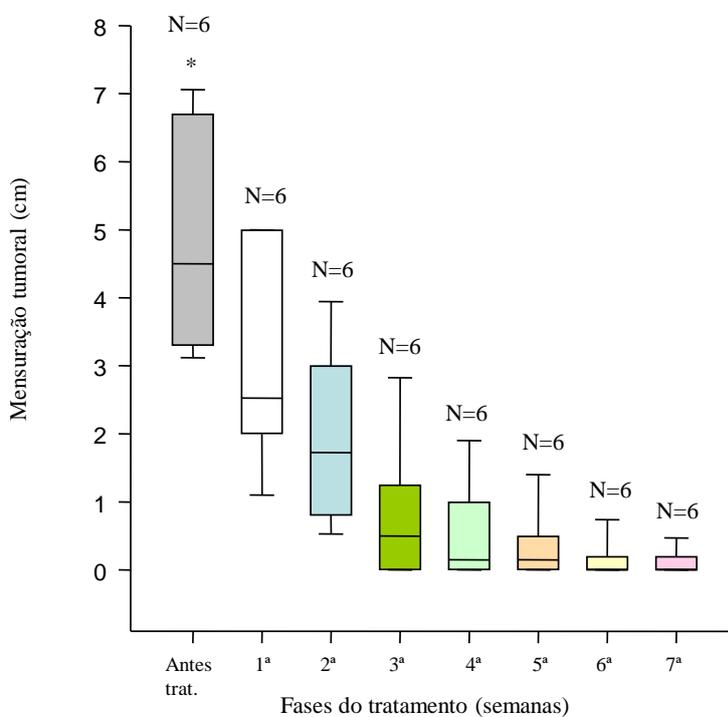


Fig.3. Mensuração tumoral em cadelas com tumor venéreo transmissível (mediana e intervalo em percentis 25 e 75) antes e após tratamento com associação de autohemoterapia e vincristina. N = número de animais por grupo. \*( $p < 0,0001$ ) (teste de Kruskal Wallis e Student-Newman-Keuls).

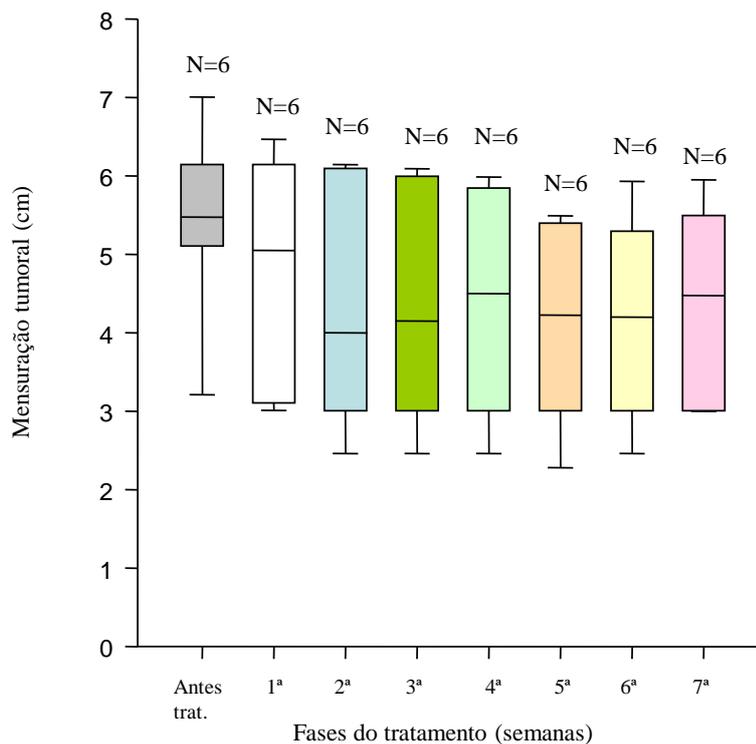


Fig.4. Mensuração tumoral em cadelas com tumor venéreo transmissível (mediana e intervalo em percentis 25 e 75) antes e após tratamento com autohemoterapia. N = número de animais por grupo. Não houve diferença significativa ( $p = 0,853$ ).

Um animal (16,6%) do grupo tratado com vincristina (G1) não respondeu à terapia, ou seja, o tumor não regrediu completamente após o tratamento. Nas cadelas tratadas com associação de autohemoterapia e vincristina (G3) ocorreu o mesmo em dois (33%) animais. Nesses foram feitas sete aplicações do quimioterápico e ainda havia presença de massa tumoral, mesmo que pequena.

Alguns casos de resistência tumoral à vincristina já foram relatados na literatura (Gonçalves & Momesso 2004; Nak et al. 2005, Rogers et al. 2006). As causas deste evento ainda não foram completamente elucidadas (Gaspar et al. 2008). A resistência também pode ser explicada pela variação individual de resposta dos pacientes à quimioterapia (Silva et al. 2007). Como a metodologia de tratamento empregada está de acordo com a literatura (Rosenthal 1997), estes casos tratados com vincristina que não responderam à medicação sugerem resistência. No entanto, isto não pode ser afirmado porque o tratamento não foi prolongado. Nestas cadelas, não foram instituídos outros tipos de tratamento, pois os

proprietários optaram por não realizá-los. Nos animais que responderam à vincristina, ao final do tratamento, foi observada normalidade da mucosa vulvar e vaginal. As aplicações do quimioterápico variaram de 3 a 7 nas cadelas do G1 e G3.

A vincristina pode causar mielossupressão em grau leve, neuropatia periférica, parestesia, anorexia, hipersensibilidade, manifestações gastrintestinais, renais, hematológicas e pulmonares (Oliveira 2005). Durante o tratamento com vincristina em alguns animais de G1 e G3 foram observados sinais clínicos relacionados a estes efeitos colaterais (alopecia, inapetência, vômito e diarreia). Não foi necessário tratamento sintomático porque os sinais clínicos foram discretos e regrediram rapidamente. Os animais tratados com autohemoterapia (G2) não apresentaram efeito colateral.

Nas cadelas do G2, apesar de não haver diferença significativa antes e após o tratamento com autohemoterapia, observou-se, macroscopicamente, diminuição da massa tumoral (Fig.5) em três animais. Como houve padronização do número de aplicações da autohemoterapia nos animais estabeleceu-se um critério de parada do tratamento ao completar sete semanas. Possivelmente se o tratamento tivesse sido prolongado a regressão poderia ter sido completa.

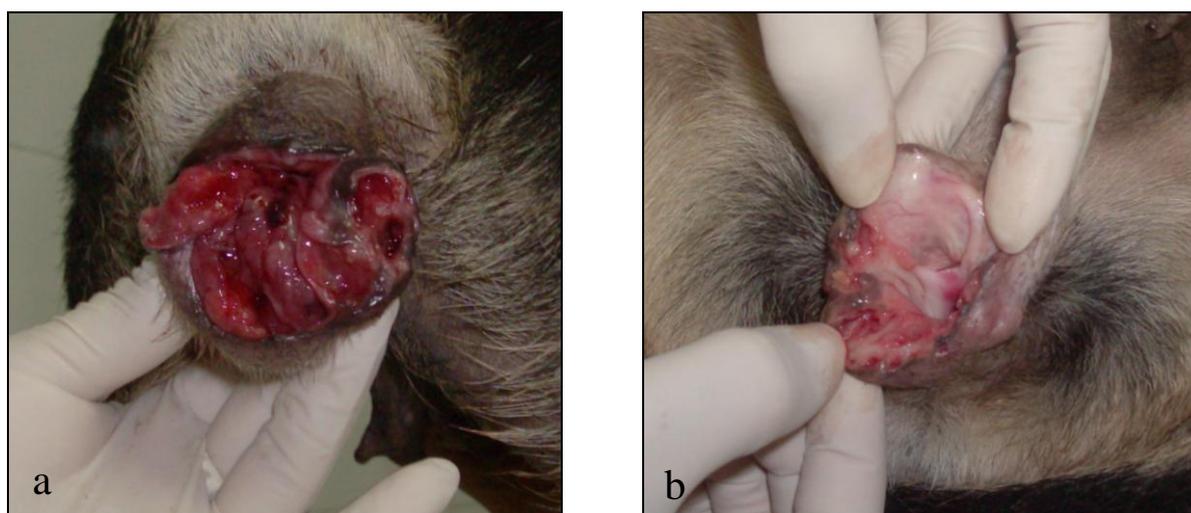


Fig.5. Tumor venéreo transmissível em cadela, sem raça definida, adulta tratada com autohemoterapia: (a) massa tumoral antes do tratamento, de coloração avermelhada, bastante friável e sangrante e (b) massa tumoral após quatro aplicações de autohemoterapia. Observar regressão da massa tumoral, coloração róseo-pálida e pouco sangrante.

## **Proliferação celular**

Dos 18 fragmentos tumorais coletados antes do tratamento, três animais (um do G1 e dois do G2) não apresentaram células positivas para Ki-67 e sete, distribuídos entre os três grupos (dois do G1, um do G2 e quatro do G3), apresentaram pequena quantidade de células positivas para Ki-67. Nos demais havia alta taxa de proliferação celular. O ideal teria sido realizar uma triagem com base no Ki-67 e incluir no experimento apenas cadelas que estivessem na fase progressiva. No entanto, algumas delas eram de procedência particular e os proprietários aceitaram participar da pesquisa na expectativa de que seus animais fossem tratados. Outras cadelas foram oriundas de uma parceria feita com a Associação Piauiense de Proteção e Amor aos Animais (APIPA), a qual esperava conseguir adoção para as cadelas após o tratamento. Desta forma, não foi possível excluir os animais da pesquisa.

Após análise morfométrica dos tecidos neoplásicos, observou-se que nas cadelas do G1 e G3 que o número de células em proliferação foi significativamente maior antes que após o tratamento ( $p = 0,0202$ ;  $p = 0,00982$ , respectivamente) (Fig.6 e 7). Entre os animais do G1 e G3, não houve diferença significativa ( $p = 0,5732$ ). Entre as cadelas do G2 e os demais grupos, houve diferença significativa ( $p = 0,00549$ ), o que permitiu a constatar que o tratamento utilizado nos animais do G1 e G3 foi superior ao tratamento realizado nas cadelas do G2.

A diferença significativa na contagem de células positivas para Ki-67 antes e após o tratamento nas cadelas do G1 e G3 também foi encontrada em outras pesquisas realizadas com TVT tratado com vincristina (Gonzalez et al. 2000). Já foi provado que durante o tratamento com vincristina ocorre parada da proliferação celular (Gonzalez et al. 2000) como observado no presente estudo.

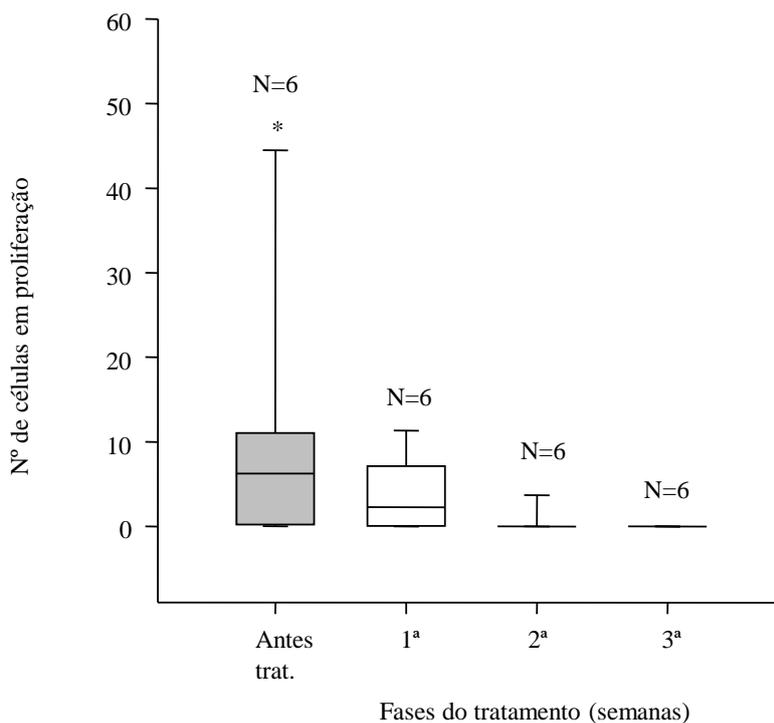


Fig.6. Análise morfométrica de células de tumor venéreo transmissível canino positivas para Ki-67 (mediana e intervalo em percentis 25 e 75) antes e após tratamento com vincristina. N = número de animais por grupo. \* ( $p = 0,0202$ ) (teste de Kruskal Wallis e Dunn).

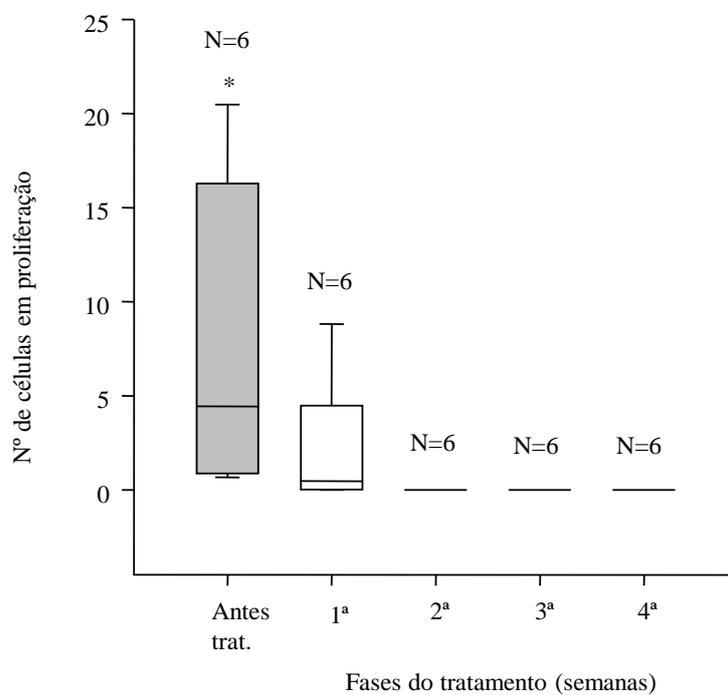


Fig.7. Análise morfométrica de células de tumor venéreo transmissível canino positivas para Ki-67 (mediana e intervalo em percentis 25 e 75) antes e após tratamento com associação de autohemoterapia e vincristina. N = número de animais por grupo. \* ( $p = 0,00982$ ) (teste de Kruskal Wallis e Dunn).

Nos animais do G2 foi observado que não houve diferença significativa ( $p = 0,979$ ) (Fig.8) entre a contagem de células antes e durante as fases do tratamento. Porém, foi observada macroscopicamente, em três animais, regressão parcial da massa tumoral. Apenas em um animal isso foi comprovado pela diminuição da quantidade de células positivas para Ki-67 e aumento da quantidade de células apoptóticas. Nos outros dois, isso não ocorreu.

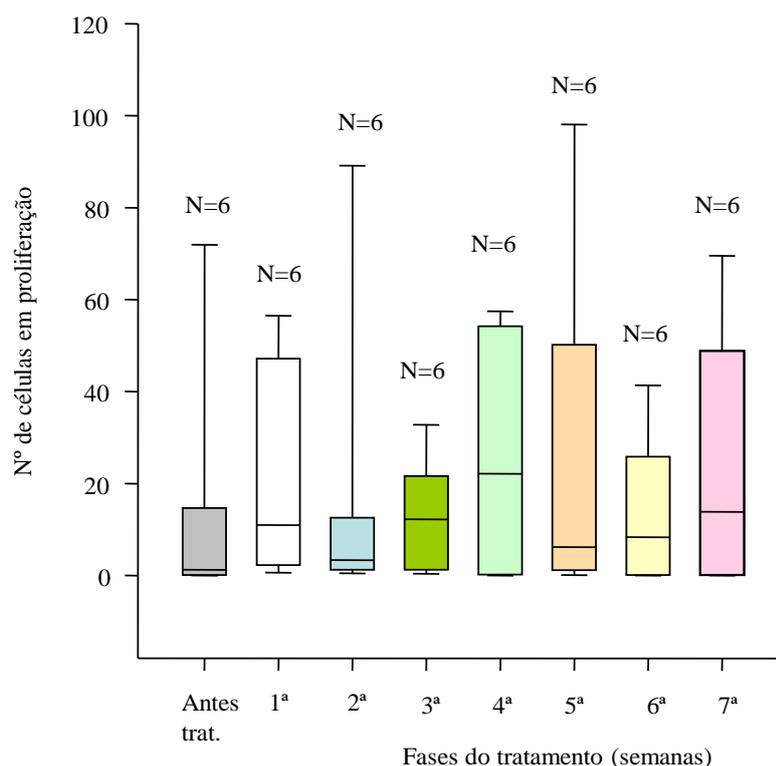


Fig.8. Análise morfométrica de células de tumor venéreo transmissível canino positivas para Ki-67 (mediana e intervalo em percentis 25 e 75) antes e após tratamento com autohemoterapia. N = número de animais por grupo. Não houve diferença significativa ( $p = 0,979$ ).

Na fase de regressão tumoral ocorre aumento do infiltrado de linfócitos T e de macrófagos demonstrando que essas células atuam de forma efetiva nessa fase (Pérez et al. 1998). A autohemoterapia atua promovendo crescimento do número de macrófagos celulares e induz um aumento da imunidade orgânica (Schurer-Waldheim 1933). É provável que esse tratamento tenha contribuído para promover a diminuição das células positivas em um animal do G2 e promovido, também, a regressão macroscópica parcial da massa tumoral nas outras duas cadelas desse mesmo grupo. Cabe destacar que os animais não foram submetidos a

qualquer outro tratamento e, mesmo, se a regressão tivesse sido influenciada pela redução do processo inflamatório, sabe-se que a autohemoterapia aumenta a imunidade e, conseqüentemente, contribui para aumentar a resistência do organismo frente a qualquer agressão.

As células em proliferação apresentaram coloração amarronzada que variaram com relação à intensidade (Fig.9a). Durante o tratamento utilizado nos animais do G1 e G3 o tecido tumoral foi infiltrado por grande quantidade de fibras colágenas e fibroblastos. Sugere-se que essas células demonstraram reatividade para o anticorpo Ki-67 (Fig.9b).

Fig.9. Tumor venéreo transmissível em cadela adulta, sem raça definida antes (a) e após tratamento com vincristina (b): (a) células em proliferação de coloração amarronzada presente em vários tons (→), mitose (→) e (b) tecido tumoral invadido por fibras colágenas e fibroblastos marcados com o anticorpo Ki-67 (→). obj.40x.

## **Apoptose**

Foram observadas células com núcleos de coloração amarronzada, condensados, hipercromáticos, retraídos e por vezes fragmentados, que apareciam isoladamente em células esparsas ou em pequenos grupos celulares, com retração citoplasmática e halos claros (Fig.10).



Fig.10. Tumor venéreo transmissível, em cadela adulta, sem raça definida. Presença de células apoptóticas com núcleos de coloração amarronzada, retraídos e isolados, de tamanhos variados e halos claros (→). obj.40x

Nas lâminas examinadas neste estudo não foi observada diferença significativa ( $p = 0,0783$ ) entre os três grupos, em relação às células em apoptose. Após o tratamento com vincristina, a percentagem de células apoptóticas em tumores em regressão aumenta significativamente (Gonzalez et al. 2000). Apesar de o mesmo não ter ocorrido de forma significativa nos animais do G1 e G3, nos quais foi usado o quimioterápico, houve aumento na contagem das células em apoptose após o tratamento (Fig.11 e 12, respectivamente), coincidindo com a diminuição e posterior parada da proliferação celular.

A apoptose é um evento celular que está presente no TVT e que pode ser usada para identificar a fase tumoral (Santos et al. 2001). O índice apoptótico e número de células apoptóticas permitem diferenciar as duas fases de evolução (progressiva e regressiva) tanto no tumor transplantado experimentalmente (Santos, 2002) quanto no tumor transplantado naturalmente. Esse evento pode ocorrer tanto em neoplasias não tratadas como pode ser induzido terapêuticamente (Gonzalez et al. 2000).

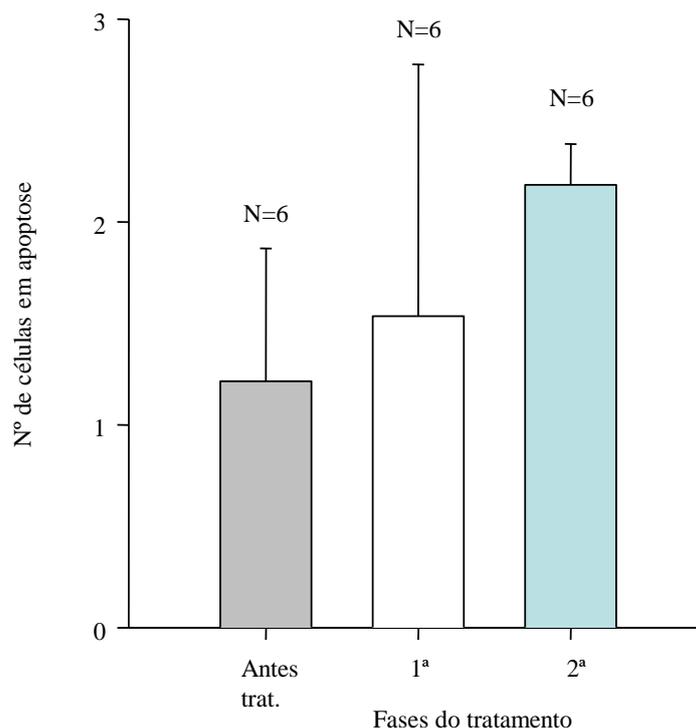


Fig.11. Análise morfométrica de células em apoptose de tumor venéreo transmissível canino antes e após tratamento com vincristina. N = número de animais por grupo. Não houve diferença significativa (0,367).

Nas cadelas do G2 não foi observada diferença significativa antes e após o tratamento ( $p = 0,734$ ) (Fig.13). Porém em um animal foi observado uma tendência de aumento (não significativo) da quantidade de células em apoptose que coincidiu com a diminuição da quantidade de células em proliferação. Não foi identificada a causa desse evento, porém sugere-se que esteja associada à imunidade individual. Em tumores a apoptose pode aumentar em consequência da ativação de mecanismos imunocelulares como secreção de citocinas (TNF $\alpha$ ), pelas células mononucleares do infiltrado e de granzimas e perforinas, por células T citotóxicas (CD8+) (Liles 1997). Sabe-se que a autohemoterapia estimula a produção de macrófagos (Schurer-Waldheim 1933). Apesar disso, não se pode afirmar que esse tipo de tratamento tenha contribuído de alguma forma para a ocorrência do aumento das células apoptóticas durante as fases do tratamento no animal em que foi observada diminuição da massa tumoral.

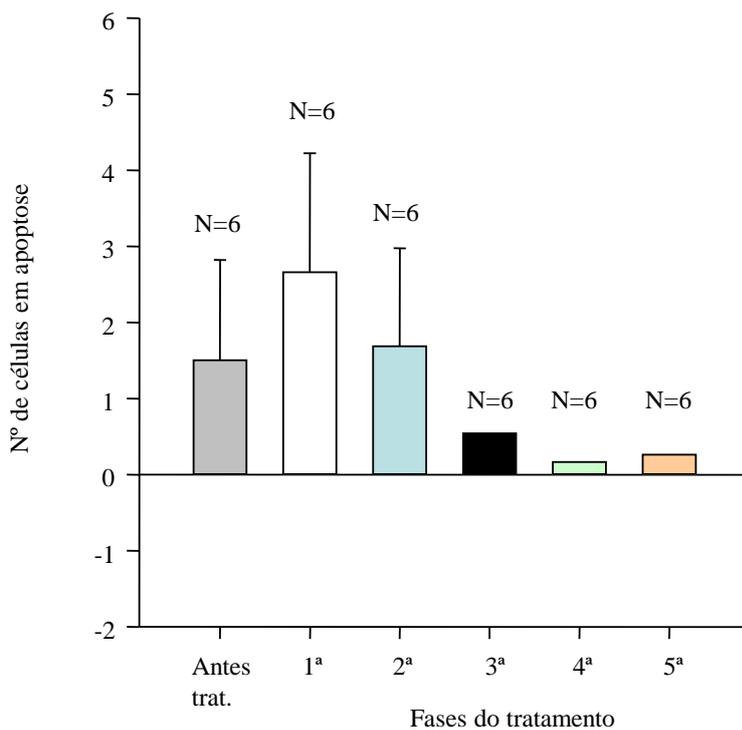


Fig.12. Análise morfométrica de células em apoptose de tumor venéreo transmissível canino antes e após tratamento com associação de autohemoterapia e vincristina. N = número de animais por grupo. Não houve diferença significativa (0,480).

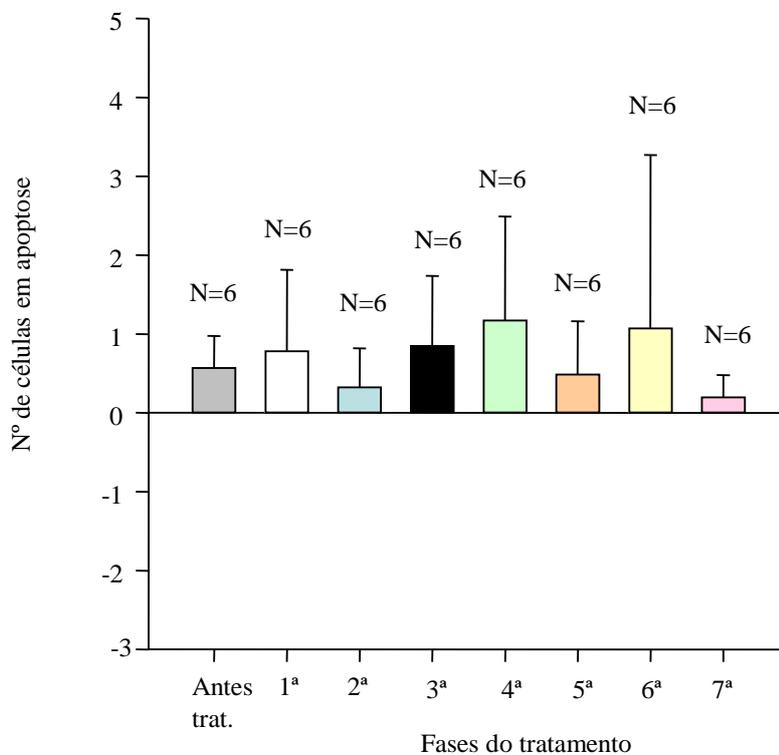


Fig.13. Análise morfométrica de células em apoptose de tumor venéreo transmissível canino antes e após tratamento com autohemoterapia. N = número de animais por grupo. Não houve diferença significativa (0,734).

### **Achados hematológicos e bioquímicos**

Embora não tenha ocorrido diferença significativa entre os números de plaquetas ( $p = 0,987$ ), hemácias ( $p = 0,497$ ) e leucócitos totais ( $p = 0,172$ ) antes e após o tratamento nas cadelas do G1 (Anexo), foram observadas alterações hematológicas antes e após o tratamento em algumas fases. As principais alterações foram: anemia (33%), trombocitopenia (33%), trombocitose (33%) e leucopenia (33%). Também não houve diferença significativa entre os números de plaquetas ( $p = 0,947$ ), hemácias ( $p = 0,741$ ) e leucócitos totais ( $p = 0,169$ ), antes e após o tratamento nos animais do G3 (Anexo). Nesse grupo, 66% (quatro) dos animais apresentaram anemia e trombocitose, 33% (dois) apresentaram trombocitopenia e 50% (três) apresentaram leucopenia. Em G1 e G3, embora alguns animais apresentassem valores normais, houve uma tendência de diminuição no número de hemácias e leucócitos totais ao longo do tratamento. Não foi observada essa tendência em relação às plaquetas. Isso provavelmente ocorreu devido à depressão medular induzida pela vincristina (Oliveira 2005, Perez et al. 2005), a qual se caracterizou por apresentar anemia e leucopenia mais acentuadas que a trombocitopenia como ocorreu em outro estudo (Perez et al. 2005). Paradoxalmente, a vincristina também pode estimular a medula óssea causando trombocitose secundária ou reativa (Maia 2006). Este efeito foi observado em alguns animais do G1 e G3, os quais apresentaram trombocitose.

Nas cadelas do G2 não houve diferença significativa entre os números de hemácias ( $p = 0,110$ ) e plaquetas ( $p = 0,0708$ ) antes e após o tratamento com autohemoterapia (Anexo). Todos os animais (100%) apresentaram anemia e trombocitopenia durante as várias fases do tratamento. Houve diferença significativa ( $p = 0,0122$ ) entre os níveis de leucócitos antes e após o tratamento (Anexo). Antes do tratamento 100% dos animais apresentaram leucocitose e no decorrer do tratamento com autohemoterapia as taxas diminuíram até apresentarem níveis normais. Não foi encontrada explicação satisfatória para este evento. No entanto, estes

animais poderiam estar apresentando infecções intercorrentes (evidenciadas pela leucocitose) não detectadas no exame clínico, as quais poderiam ter respondido positivamente ao tratamento com autohemoterapia. Esta técnica foi usada em infecções pós-operatórias em humanos com sucesso (Teixeira 1940).

Não foi possível estabelecer uma relação direta entre a presença do TVT e a presença das alterações hematológicas encontradas nesses animais. O mesmo aconteceu em outra pesquisa (Aptekmann et al. 2005). Portanto, não se pode afirmar que a presença dessas alterações se deu por ação do tumor. Outra explicação para elas é que alguns destes animais foram recolhidos das ruas, aumentando a possibilidade de patologias intercorrentes.

Não houve diferença significativa entre os níveis de uréia ( $p = 0,860$ ), creatinina ( $p = 0,881$ ), alanina aminotransferase ( $p = 0,834$ ), proteína total ( $p = 0,634$ ), albumina ( $p = 0,834$ ) e globulina ( $p = 0,698$ ) nos três grupos, antes e após o tratamento (Anexo). Os níveis se mantiveram normais durante todas as fases, exceto os níveis de proteína total, albumina e globulina. Apesar de a vincristina poder provocar alterações renais (Oliveira 2005), a função renal das cadelas do G1 e G3 estava normal, fato comprovado pelos níveis normais de uréia e creatinina. Com relação à proteína total, albumina e globulina, os cães dos três grupos apresentaram inversão de albumina/globulina, provavelmente devido à produção de anticorpos contra a neoplasia.

## 2.4 CONCLUSÕES

Concluiu-se que a autohemoterapia promoveu regressão macroscópica parcial da massa tumoral em 50% dos animais submetidos a esse tratamento, o que vem estimular o aprofundamento de pesquisas nesta área. A autohemoterapia não provocou efeitos colaterais.

**Agradecimentos.-** Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí pelo apoio financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela bolsa de mestrado.

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts B. 2004. Ciclo celular e morte celular programada, p.983-1026. In: \_\_\_\_\_. (ed.), *Biologia molecular da célula*. 4 ed. Artmed, Porto Alegre. 1584p.
- Andrade S.F., Oliveira C.M.N.L., Cotta-Luizari F., Haddad R.R., Barbour L.F., Sanches J.C. & Mendonça M.F. 1999. Normas de segurança para o uso de vincristina no tratamento de tumor venéreo transmissível canino em cães. *Clín. Vet.*, 6(18):32-33.
- Aptekmann K.P., Costa M.T., Fabeni R.C., Machado R.Z. & Santana A.E. 2005. Avaliação comparativa da hemopoiese e do perfil seroprotéico de cães portadores de tumor venéreo transmissível de ocorrência natural e induzido através de transplantes alogênicos. *Vet. Not.*, 11(1):25-34.
- Arisawa E.A.L., Moraes E., Rocha R.F. & Almeida J.D. 1999. Marcadores Biológicos: PCNA e Ki-67. Breve Revisão. *Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos*, 2(1):54-60.

Cesarino M., Ávila D.F., Fernandes C.C., Silva C.B., Scherer D.L., Dias T.A. & Mendonça C.S., Castro J.R. 2008. Efeito da autohemoterapia associada com clorbutanol no tratamento da papilomatose oral em cão (*Canis familiaris*) – Relato de caso. In: SEMANA CIENTÍFICA DE MEDICINA VETERINÁRIA DE UBERLÂNDIA, 20., 2008, Uberlândia. Resumos...Uberlândia: Universidade federal de Uberlândia. p.62. Disponível em: [http://www.famev.ufu.br/documentos/anais\\_secivet\\_2008.pdf](http://www.famev.ufu.br/documentos/anais_secivet_2008.pdf). (Acesso em 20 de dezembro de 2008).

Chandler J.P. & Yang T.J. 1981. Canine transmissible venereal sarcoma: distribution of T and B lymphocytes in blood, draining lymph nodes and tumours at different stages of growth. *Br. J. Cancer*, 44(4):514-521.

Chu R.M., Lin C.Y., Liu C.C., Yang S.Y., Hsiao Y.W., Hung S.W., Pao H.N. & Liao K.W. 2001. Proliferation characteristics of canine transmissible venereal tumor. *Anticancer Res.*, 21(6A):4017-4024.

Garcia C.A., Stanziola L., Andrade I.C.V., Neves S.M.N. & Garcia L.A.D. 2008. Autohemoterapia maior ozonizada no tratamento de habronemose em equino – relato de caso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. Resumos...Gramado: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. 1 CD-ROM.

Gaspar L.F.J., Amaral A.S., Bassani-Silva S. & Rocha N.S. 2008. Imunorreatividade à glicoproteína-p no tumor venéreo transmissível canino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. Anais...Gramado: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0681-2.pdf>. (Acesso em 9 de janeiro de 2009).

Geovanini T. & Norberto M.M.C. 2006. Tratamento de feridas através da autohemoterapia: um estudo de caso clínico. Uni. Pres. Antônio Carlos de Juiz de Fora. Disponível em: [www.geocities.com/autohemoterapiabr/TRATAMENTO\\_DE\\_FERIDAS\\_AUTOHEMOTERAPIA\\_Prof\\_Telma.pdf](http://www.geocities.com/autohemoterapiabr/TRATAMENTO_DE_FERIDAS_AUTOHEMOTERAPIA_Prof_Telma.pdf). (Acesso em 2 de setembro de 2008).

Greatti W.F.P., Amaral A.S., Silva S.B., Gaspar L.F.J., Barbisan L.F. & Rocha, N.S. 2004. Índices proliferativos do tumor venéreo canino transmissível pelas técnicas do CEC e Ki-67 na citologia aspirativa com agulha fina. Arch. Vet. Sci., 9(1):53-59.

Gonçalves C.M. & Momesso C.G. 2004. Resistência ao sulfato de vincristina em cadela com tumor venéreo transmissível: revisão literária e relato de caso. In: CONGRESSO PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 6., 2004, Santos. Resumos...Santos: Congresso Paulista de Medicina Veterinária. Disponível em: <http://www.spmv.org.br/conpavet2004/comissao.htm>. (Acesso em 14 de março de 2008).

- Gonzalez C. M., Griffey S.M., Naydan D.K., Flores E., Cepeda R., Cattaneo G. & Madewell B. R. 2000. Canine transmissible venereal tumour: a morphological and immunohistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regression after chemotherapy. *J. Comp. Pathol.*, 122(4):241-248.
- Guvenc T., Haligur M., Orman M.N. & Hazirolu R. 2002. Mitosis and apoptosis in canine cutaneous histiocytoma and transmissible venereal tumour. *Acta Vet. Hung.*, 50(3):315-321.
- Hsiao Y., Liao K-W., Hung S-W. & Chu R-M. 2002. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. *Vet. Immunol. and Immunopathol.*, 87(1):19-27.
- Johnson C.A. 1994. Infecções genitais e tumor venéreo transmissível, p.522-525. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. (ed.), *Fundamentos de medicina interna de pequenos animais*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 737p.
- Lefebvre G.N.F., Bonamin L.V. & Oliveira C.M. 2007. Tratamento de tumor venéreo transmissível (tvt) canino utilizando *Viscum album* em associação à autohemoterapia. *Clín. Vet.*, 12(70):78-86.
- Liao K., Hunga S-W., Hsiao Y-W., Bennett M. & Chu, R-M. 2003. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 92(3-4):149-162.

- Liles W.C. 1997. Apoptosis - role in infection and inflammation. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 10:165-170.
- Magalhães A.M., Ramadinha R.R., Barros C.S. L. & Peixoto P.V. 2001. Estudo comparativo entre citopatologia e histopatologia no diagnóstico de neoplasias caninas. *Pesq. Vet. Bras.*, 21(1):23-32.
- Maia L. 2006. Alterações plaquetárias - parte 2. Informe científico. Disponível em: [http://www.laboratorigenesi.com.br/artigos/4\\_informe%20cient%EDfico%20-%20plaquetas%20parte%20II%20.pdf](http://www.laboratorigenesi.com.br/artigos/4_informe%20cient%EDfico%20-%20plaquetas%20parte%20II%20.pdf). (Acesso em de 2 agosto de 2008).
- Manhoso F.F.R., Santos P.C.G., Silva E.L. & Santos Filho D.N. 1997. Homeopatia e quimioterapia no tratamento de tumor venéreo transmissível e seus aspectos hematológicos. *Pesq. Homeop.*, 12(2):50-64.
- Marchal T., Chabanne L., Kaplanski C., Rigal D. & Magnol J.P. 1997. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 57(1-2):1-11.
- Martínez M.M., Ballut J.C. & Cardona J.A. 2002. Tumor venéreo transmissible (TVT) de localización extragenital. *MVZ Córdoba.*, 7(1):168-170.
- Nak D., Nak Y., Cangul I T. & Tuna B. 2005. A clinico-pathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumour in dogs. *J. Vet. Med.*, 52(7):366-370.

- Nascimento E.F. & Santos R.L. 1997. Patologias da cérvix, da vagina e da vulva, p.75-78. In: \_\_\_\_\_ (ed.), Patologia da reprodução dos animais domésticos. 1 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 108p.
- Oliveira A.C. 2005. Vincristina. Universidade de Brasília. 21p. Disponível em: <http://www.unb.br/fm/disciplinas/123676/vin.pdf>. (Acesso em 18 de outubro de 2008).
- O'Keefe D.A. 1997. Tumores do sistema genital e das glândulas mamárias, p.2344-2351. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. (ed.), Tratado de medicina interna veterinária. 4 ed. Manole LTDA, São Paulo. 3020p.
- Park M., Kim Y., Kang M-S., Oh S-Y., Cho D-Y., Shin N-S. & Kim D-Y. 2006. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. J. Vet. Diagn. Invest., 18(1):130-133.
- Pérez J., Day M.J.J. & Mozos E. 1998. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. Vet. Immunol. Immunopathol., 64(2):133-147.
- Perez R.R., Silva M.A.M.L.S., Varzim F.L.S.B., Oliveira S.B. & Hucke É.E.T.S. 2005. 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®). Ciên. Rural, 35(2):589-595.
- Prophet E.M., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. 1992. Laboratory methods in histotechnology. Armed Force Institute of Pathology, Washington. 275p.

- Quinn C.M. & Wright N. 1990. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J. Pathol.*, 160(2):93-102.
- Ramos J.K.M., Carvalho C.M.E. & Babo-Terra V.J. 2006. Tumor venéreo transmissível canino extragenital tratado com ciclofosfamida. *Nos. Clín.*, 9(52):38-42.
- Robenhorst S.H., Burini R.C. & Schmitt F.C.L. 1993. Marcadores de proliferação celular. *Rev. Bras. Patol. Clín.*, 29(1):24-29.
- Rogers K.S., Walker M.A. & Dillon H.B. 1998. Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 42(2):94-109.
- Rosenthal R.C. 1997. Quimioterapia, p.676-691. In: Ettinger S.J., Feldman E.C. (ed.), *Tratado de medicina interna veterinária*. 4 ed. v.1. Manole, São Paulo. 3020p.
- Santin A.P.I. & Brito L.A.B. 2004. Estudo da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros: comparação de diferentes tratamentos. *Ciê. Anim. Bras.*, 5(1):39-45.
- Santos F.G.A., Vasconcelos A.C., Moro L., Nunes J.E.S. & Paixão T.A. 2001. Apoptose no tumor venéreo transmissível canino: características morfológicas e evidência bioquímica. *Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.*, 53(5):557-562.

Santos F.G.A. 2002. Morfologia, morfometria e imuno-histoquímica das fases de crescimento e regressão espontânea do tumor venéreo transmissível canino. 81p. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Santos F.G.A., Vasconcelos A.C., Nunes J.E.S., Cassali G.D., Paixão T.A. & Moro L. 2005. O tumor venéreo transmissível canino – aspectos gerais e abordagens moleculares (revisão de literatura). Biosc. J., 21(3):41-53.

Schürer-Waldheim F. 1933. Über die Wirkungsweise der Eigenblutbehandlung. Lang. Arch. Surg., 239(11-12):352-362.

Silva L.A.F., Veríssimo A.C.C., Viana Filho P.R.L., Fioravanti M.C.S., Linhares D.; Fontgalland G.C., Romani, A.F. & Trindade B.R. 2004. Eficiência da repetição de diferentes protocolos de tratamentos para papilomatose bovina. Rev. Fac. Zootec. Vet. Agron., 11(1): 153-165.

Silva M.C.V. Barbosa R.R., Santos R.C., Chagas R.S.N. & Costa W.P. 2007. Avaliação epidemiológica, diagnóstica e terapêutica do tumor venéreo transmissível (TVT) na população canina atendida no hospital veterinário da UFERSA. Acta Vet. Bras., 1(1):28-32.

Soares T.M.P. 2007. Efeito do *Syphonosporinum* no tratamento do tumor venéreo transmissível na espécie canina. 2007. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Médicas, UEC, Campinas.

Sousa J., Saito V., Nardi A.B., Rodaski S., Guérios S.D. & Bacila M. 2000. Características e incidência do tumor venéreo transmissível (TVT) em cães e eficiência da quimioterapia e outros tratamentos. Arch. Vet. Scienc., 5:41-48.

Teixeira J. 1940. Complicações pulmonares pós-operatórias. Rev. Bras. Cirúrg., 2(3):213-230.

Verçosa B.L.A, Batista Filho D.M., Silva S.V., Passos D.A., Climaco G.T., Barbosa R.D., Costa F.A.L. & Junior F.S.F. 2007. Sarcóide equino: relato de caso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 34., 2007, Santos. Resumos...Santos: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, p.243. Disponível em: <http://www.spmv.org.br/conbravet2007/dados/web-trabalhos-equinos.htm>. (Acesso em 4 março de 2008).

Veríssimo C.J. & Katiki L. 2008. Ectima contagioso em um rebanho ovino e tratamento com autohemoterapia ou iodo. Inforum. Disponível em: <http://74.125.47.132/search?q=cache:NRpMMjpJ3bQJ:inforum.insite.com.br/39550/6010012.html+ectima+contagioso+autohemoterapia&hl=pt-BR&ct=clnk&cd=1&gl=br>. (Acesso em 28 de março de 2008).

**ANEXO**

## AUTOHEMOTERAPIA – DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA



Fig.1. Cadela adulta, sem raça definida, com tumor venéreo transmissível. Colheita de sangue total da veia jugular esquerda, para realização de autohemoterapia.

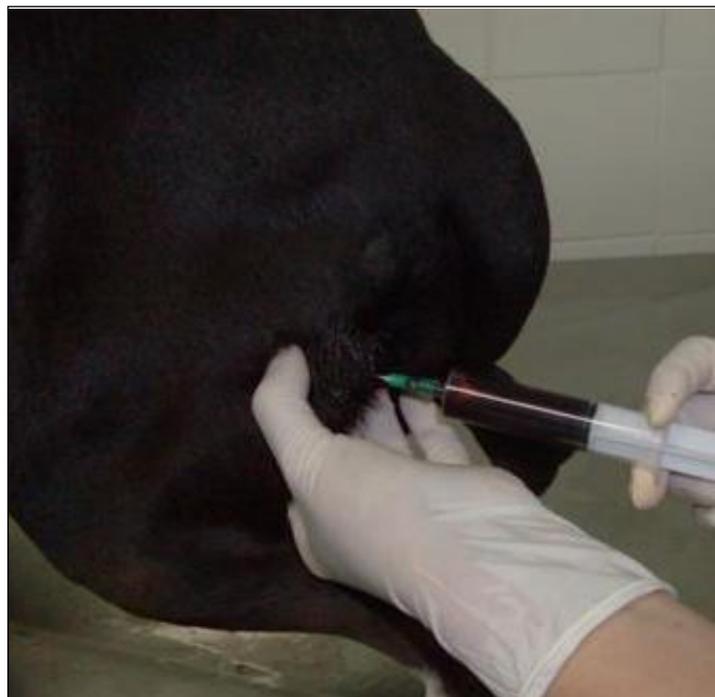


Fig.2. Cadela adulta, sem raça definida, com tumor venéreo transmissível. Aplicação de sangue total nos músculos glúteos (autohemoterapia).

## TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL – DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA



Fig.1. Tumor venéreo transmissível extragenital. Cadela adulta, sem raça definida, antes do tratamento com associação de autohemoterapia e vincristina. Neoplasia localizada próximo à glândula mamária inguinal direita, medindo 5,5 cm.



Fig. 2. Tumor venéreo transmissível extragenital. Cadela adulta, sem raça definida, após primeira aplicação de autohemoterapia e vincristina. Neoplasia medindo 2,85 cm.



Fig. 3. Tumor venéreo transmissível. Cadela adulta, sem raça definida, antes do tratamento com autohemoterapia. Neoplasia friável e muito sangrante.



Fig. 4. Tumor venéreo transmissível. Cadela adulta, sem raça definida, após quinta aplicação de autohemoterapia. Diminuição da massa tumoral.

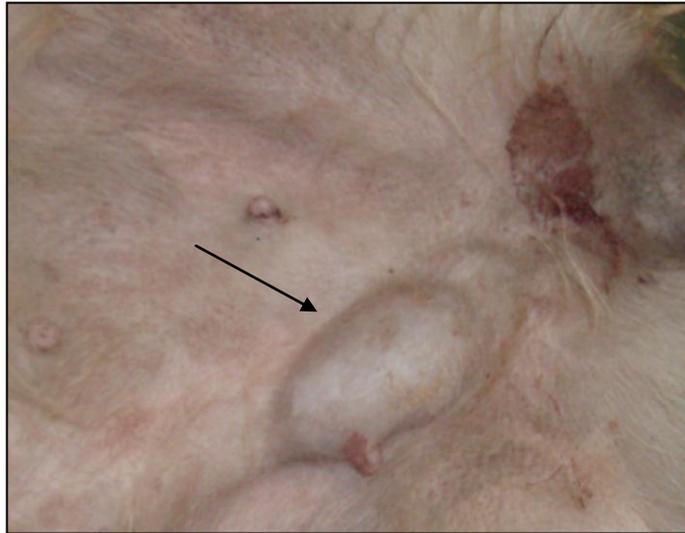


Fig. 5. Metástase de tumor venéreo transmissível. Cadela adulta, sem raça definida, com aumento de volume do linfonodo inguinal esquerdo.

## HISTOPATOLÓGICO - DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

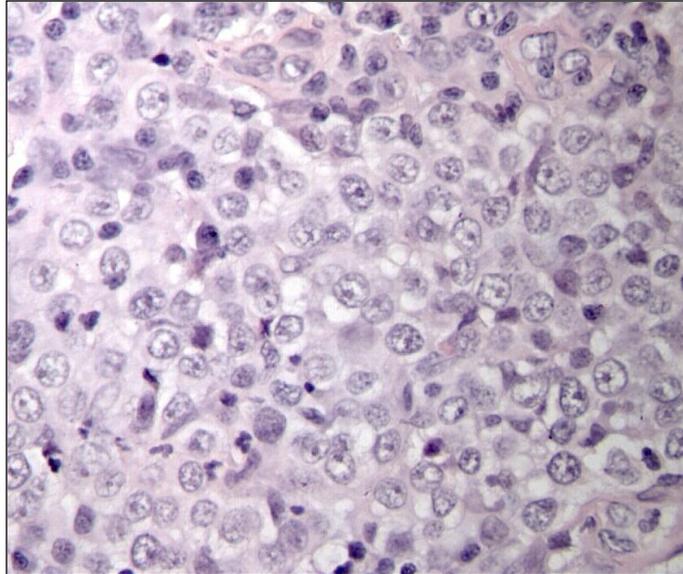


Fig.1. Tumor venéreo transmissível. Cadela adulta, sem raça definida. Notar células arredondadas, com padrão epitelial, contendo núcleo arredondado, único, arroxeadado e excêntrico, com pequena proporção núcleo:citoplasma. Coloração H-E. Aumento: 140x.

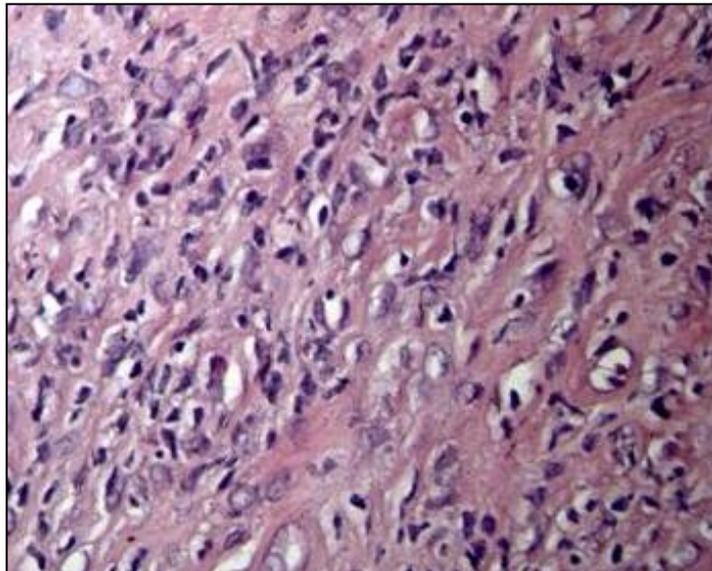


Fig.2. Tumor venéreo transmissível. Cadela adulta, sem raça definida após tratamento com vincristina. Observar tecido tumoral invadido por fibroblastos e fibras colágenas. Coloração: H-E. Aumento 140x.

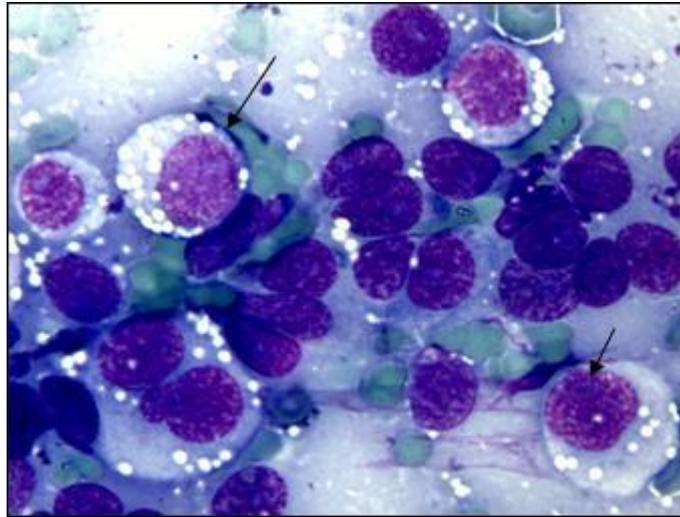
**CITOLÓGICO - DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA**

Fig.1. Tumor venéreo transmissível. Cadela adulta, sem raça definida. Células grandes e arredondadas, contendo núcleo redondo único arroxeadado e excêntrico, com pequena proporção núcleo:citoplasma. Citoplasma levemente corado e com vacúolos bem definidos. Nucléolo azulado, localizado centralmente (setas). Coloração: Giemsa. Aumento: 350x.

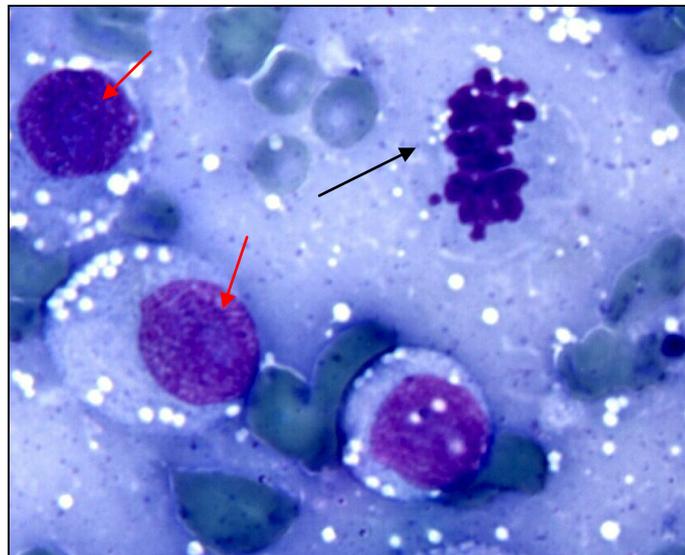


Fig.2. Tumor venéreo transmissível. Cadela adulta, sem raça definida. Células grandes e arredondadas, contendo núcleo redondo único arroxeadado e excêntrico, com pequena proporção núcleo:citoplasma. Citoplasma levemente corado e com vacúolos bem definidos. Nucléolo azulado, localizado centralmente (setas vermelhas). Mitose (seta preta). Coloração: Giemsa. Aumento: 350x.

## APOPTOSE - DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

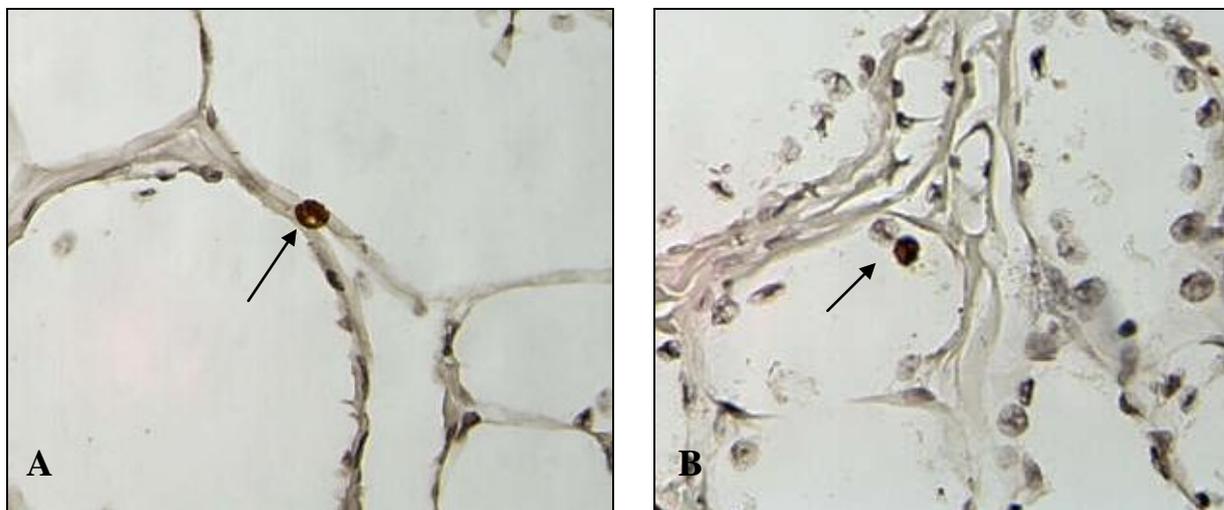


Fig.1. A e B. Controle positivo em tecido mamário de fêmea normal de roedor. Células em apoptose (seta). Aumento: 140x.

## VALORES DE REFERÊNCIA

Valores de referência hematológicos normais de cães. Fonte: GARCIA-NAVARRO, C. E. K.; PACHALY, J. R. Manual de hematologia veterinária. São Paulo: Livraria Varela Ltda, 1994. 169 p.

1. Hemácias ( $\times 10^6$ ): 5,5-8,5
2. Plaquetas ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ): 150-500
3. Leucócitos totais ( $\times 10^3$ ): 6,0-18,0

Valores de referência bioquímicos normais de cães. Fonte: DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W. Patologia Clínica Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

1. Uréia (mg/dL): 20-50
2. Creatinina (mg/dl): até 1,6
3. Alanina amino transferase (ALT): até 50
4. Proteína total (g/dL): 5,5-7,5
5. Albumina (g/dL): 2,6-4,0
6. Globulina (g/dL): 2,9-3,5

<b>Anexo 1A. Mensuração de tumor venéreo transmissível antes e após tratamento com vincristina.</b>								
<b>Mesuração tumoral (cm)</b>								
<b>Animal</b>	<b>Antes do trat.</b>	<b>1ª mens. pós-trat.</b>	<b>2ª mens. pós-trat.</b>	<b>3ª mens. pós-trat.</b>	<b>4ª mens. pós-trat.</b>	<b>5ª mens. pós-trat.</b>	<b>6ª mens. pós-trat.</b>	<b>7ª mens. pós-trat.</b>
7	4	0,5	0	0	0	0	0	0
8	6	2,5	1	0,5	0	0	0	0
9	2,9	1,6	1	0	0	0	0	0
10	2,1	1	0,5	0,2	0	0	0	0
11	4,6	3,15	1,5	0,3	0	0	0	0
12	4	3,65	3	2	0,5	0,2	0,2	0,1
<b>Média</b>	3,93	2,06	1,16	0,6	0,08	0,03	0,03	0,01

<b>Anexo 1B. Mensuração de tumor venéreo transmissível antes e após tratamento com autohemoterapia.</b>								
<b>Mesuração tumoral (cm)</b>								
<b>Animal</b>	<b>Antes do trat.</b>	<b>1ª mens. pós-trat.</b>	<b>2ª mens. pós-trat.</b>	<b>3ª mens. pós-trat.</b>	<b>4ª mens. pós-trat.</b>	<b>5ª mens. pós-trat.</b>	<b>6ª mens. pós-trat.</b>	<b>7ª mens. pós-trat.</b>
1	5,1	5,1	3	3	3,3	3,15	3,3	3,55
2	3	3	3	3	3	3	3	3
3	5,3	3,1	2,4	2,4	2,4	2,2	2,4	3
4	7,1	6,5	6,1	6	5,85	5,5	5,3	5,5
5	5,65	5	5	5,3	6	5,4	6	6
6	6,15	6,15	6,15	6,1	5,95	6,2	6,1	6,1
<b>Média</b>	5,38	4,8	4,27	4,3	4,42	4,24	4,35	4,52

<b>Anexo 1C. Mensuração de tumor venéreo transmissível antes e após tratamento com associação de autohemoterapia e vincristina.</b>								
<b>Mesuração tumoral (cm)</b>								
<b>Animal</b>	<b>Antes do trat.</b>	<b>1ª mens. pós-trat.</b>	<b>2ª mens. pós-trat.</b>	<b>3ª mens. pós-trat.</b>	<b>4ª mens. pós-trat.</b>	<b>5ª mens. pós-trat.</b>	<b>6ª mens. pós-trat.</b>	<b>7ª mens. pós-trat.</b>
13	6,7	5	4,05	3	2	1,5	0,8	0,5
14	3,3	2,2	1	0,5	0	0	0	0
15	3,1	2	0,8	0,5	0,3	0,3	0,2	0
16	7,1	5	3	1,25	1	0,5	0	0
17	3,5	1	0,5	0	0	0	0	0
18	5,5	2,85	2,45	0	0	0	0	0
<b>Média</b>	4,86	3	1,96	0,87	0,55	0,38	0,16	0,08

**Anexo 2C. Análise morfométria de células de tumor venéreo transmissível positivas para Ki-67 antes e após tratamento com associação de autohemoterapia e vincristina.**

Animal	CAMPOS																				Média	Mediana
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
<b>Antes do trat.</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>
13	1	3	12	2	1	0	4	2	5	2	5	2	3	8	1	0	0	1	1	2	2,75	2
14	0	0	4	2	1	0	0	0	0	1	0	1	5	1	2	0	0	0	0	0	0,85	0
15	66	26	72	52	7	31	22	0	0	22	17	0	0	2	5	14	0	50	33	0	20,95	15,5
16	45	29	27	7	9	25	6	5	9	6	55	8	21	21	12	19	1	2	14	5	16,3	10,5
17	14	4	2	4	8	6	12	7	4	9	5	6	4	8	0	13	7	1	6	3	6,15	6
18	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	3	3	0	3	0	0	0	0	0,65	0
<b>1ª coleta pós-trat.</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	6	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,45	0
15	1	1	1	2	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0
16	0	1	10	1	46	20	8	0	0	0	9	10	29	0	17	19	0	0	8	8	9,3	8
17	6	2	7	14	4	7	9	2	2	7	9	6	2	8	0	2	0	0	2	1	4,5	3
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>2ª coleta pós-trat.</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>3ª coleta pós-trat.</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>4ª coleta pós-trat.</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Anexo 3C. Análise morfométrica de células em apoptose de tumor venéreo transmissível canino antes e após tratamento com associação de autohemoterapia e vincristina.**

Animal	CAMPOS																				Média	Mediana	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			
<b>Antes do trat.</b>																							
13	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0,25	0	
14	6	5	1	1	0	0	5	7	6	2	0	0	0	0	20	0	0	6	-	-	3,28	1	
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	1	2	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	2	0	1	2	2	0,85	1	
18	4	0	1	0	6	1	0	0	0	2	5	3	5	1	0	0	3	0	1	1	1,65	1	
<b>1ª coleta pós-trat.</b>																							
13	5	7	2	1	1	0	1	1	4	8	2	1	5	4	3	9	0	0	5	1	3	2	
14	2	0	6	8	23	2	0	2	0	11	2	5	6	-	-	-	-	-	-	-	5,15	6	
15	3	1	2	4	0	1	1	1	0	0	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1,33	1	
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	2	0	0	2	1	4	1	5	5	0	0	1	3	0	1	3	0	0	0	0	1,4	1	
18	3	2	1	0	1	6	1	2	9	1	0	0	2	8	0	1	1	4	3	4	2,45	1,5	
<b>2ª coleta pós-trat.</b>																							
13	8	7	6	3	3	1	7	0	2	0	1	0	0	0	1	0	4	2	7	0	2,6	1,5	
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18	2	0	2	2	0	0	3	0	0	0	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	0,78	0	
<b>3ª coleta pós-trat.</b>																							
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15	0	2	2	1	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,55	0	
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>4ª coleta pós-trat.</b>																							
13	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17	0	
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	



**Anexo 4A. Valores de hemáceas, plaquetas e leucócitos totais antes e após tratamento com vincristina.**

<b>Hemáceas (x 10<sup>6</sup>)</b>	<b>Antes do trat.</b>	<b>1<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>2<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>3<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>4<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>5<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>6<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>7<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>
7	4,95	4,94	4,72	5,13	5,35	5,66	5,15	-
8	6,49	6,66	6,82	3,47	3,4	3,23	-	-
9	6,48	7,04	6,29	6,12	5,85	5,79	-	-
10	6,44	5,97	5,94	5,94	6	-	-	-
11	6,07	5,93	6,26	6,63	6,8	-	-	-
12	6	5,63	5,75	5,59	-	-	-	-
<b>Plaquetas (x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Antes do trat.</b>	<b>1<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>2<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>3<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>4<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>5<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>6<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>7<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>
7	190	179	213	252	239	351	233	-
8	117	179	331	178	70	61	-	-
9	457	417	356	542	678	380	-	-
10	219	126	120	120	85	-	-	-
11	178	503	505	323	270	-	-	-
12	335	303	285	333	-	-	-	-
<b>Leucócitos totais (x 10<sup>3</sup>)</b>	<b>Antes do trat.</b>	<b>1<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>2<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>3<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>4<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>5<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>6<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>	<b>7<sup>a</sup> col. pós-trat.</b>
7	15.200	13.000	8.800	11.500	8.700	12.100	13.000	-
8	20.200	16.900	7.500	3.800	1.500	2.300	-	-
9	15.000	38.600	11.000	21.600	14.000	24.800	-	-
10	13.200	7.000	5.400	5.400	3.900	-	-	-
11	24.900	19.000	9.800	12.700	13.400	-	-	-
12	11.600	10.500	12.200	12.100	-	-	-	-

**Anexo 5C. Valores de bioquímicos antes e após tratamento com autohemoterapia.**

<b>Uréia (mg/dL)</b>	<b>Antes do trat.</b>	<b>1ª col. pós-trat.</b>	<b>2ª col. pós-trat.</b>	<b>3ª col. pós-trat.</b>	<b>4ª col. pós-trat.</b>	<b>5ª col. pós-trat.</b>	<b>6ª col. pós-trat.</b>	<b>7ª col. pós-trat.</b>
13	47,1	32,4	-	44,5	18	14,7	35,5	35,2
14	30,5	41,6	50,9	18	32,8	-	-	-
15	36,1	29,7	48,7	51,8	-	-	-	-
16	15,8	32,6	28,7	20,5	29,4	35,4	47,5	25,4
17	45,3	33,9	29,2	40,9	44	-	-	-
18	27,3	40	37,9	40,1	35,6	27,2	23,8	-
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	<b>Antes do trat.</b>	<b>1ª col. pós-trat.</b>	<b>2ª col. pós-trat.</b>	<b>3ª col. pós-trat.</b>	<b>4ª col. pós-trat.</b>	<b>5ª col. pós-trat.</b>	<b>6ª col. pós-trat.</b>	<b>7ª col. pós-trat.</b>
13	0,9	0,7	-	1,2	0,2	0,6	0,3	0,3
14	0,8	1,6	1,2	0,8	1	-	-	-
15	1,4	0,8	1,1	1,1	-	-	-	-
16	1,2	1,6	0,9	1,4	1,2	1,8	1,3	1
17	1,4	1,1	0,9	1,2	1,3	-	-	-
18	0,7	0,8	0,5	0,6	0,9	0,6	1	-
<b>ALT (UI)</b>	<b>Antes do trat.</b>	<b>1ª col. pós-trat.</b>	<b>2ª col. pós-trat.</b>	<b>3ª col. pós-trat.</b>	<b>4ª col. pós-trat.</b>	<b>5ª col. pós-trat.</b>	<b>6ª col. pós-trat.</b>	<b>7ª col. pós-trat.</b>
13	1,9	4,3	-	5,8	3,4	3,4	15	25,5
14	7,7	8,7	16,9	10,1	13,5	-	-	-
15	7,7	11,1	15,4	13,5	-	-	-	-
16	12,5	13,5	12,5	3,4	6,7	20,7	3,4	6,7
17	5,3	15,4	5,3	11,5	7,2	-	-	-
18	10,1	11,1	10,1	10,1	10,1	10,1	8,7	-
<b>Proteína total (g/dL)</b>	<b>Antes do trat.</b>	<b>1ª col. pós-trat.</b>	<b>2ª col. pós-trat.</b>	<b>3ª col. pós-trat.</b>	<b>4ª col. pós-trat.</b>	<b>5ª col. pós-trat.</b>	<b>6ª col. pós-trat.</b>	<b>7ª col. pós-trat.</b>
13	7,8	6,8	-	7,8	7,7	7,5	11,2	13,23
14	7,8	7,5	12,4	8,6	8,6	-	-	-
15	7,7	6,9	7,3	8,9	-	-	-	-
16	6,9	7,4	6,9	7,6	7,2	9,3	7,5	7,1
17	9,62	8,4	9,94	8,4	7,5	-	-	-
18	6,9	7,7	7,1	7,6	8,4	8,5	7,5	-

<b>Albumina (g/dL)</b>	<b>Antes do trat.</b>	<b>1ª col. pós-trat.</b>	<b>2ª col. pós-trat.</b>	<b>3ª col. pós-trat.</b>	<b>4ª col. pós-trat.</b>	<b>5ª col. pós-trat.</b>	<b>6ª col. pós-trat.</b>	<b>7ª col. pós-trat.</b>
13	1,4	0,8	-	1,7	2,1	2	3,2	4,26
14	1,9	1,9	1,79	2,4	2,5	-	-	-
15	2,5	2,4	2,7	5,4	-	-	-	-
16	2,2	2,6	2,7	2,9	2,4	3,2	2,8	2,8
17	2,6	2,2	2,83	2,6	2,6	-	-	-
18	2,1	2,1	2,3	2,5	2,7	2,8	2,6	-
<b>Globulina (g/dL)</b>	<b>Antes do trat.</b>	<b>1ª col. pós-trat.</b>	<b>2ª col. pós-trat.</b>	<b>3ª col. pós-trat.</b>	<b>4ª col. pós-trat.</b>	<b>5ª col. pós-trat.</b>	<b>6ª col. pós-trat.</b>	<b>7ª col. pós-trat.</b>
13	6,4	6	-	6,1	5,6	5,5	8	8,47
14	5,9	5,6	10,61	6,2	6,1	-	-	-
15	5,2	4,5	4,6	3,5	-	-	-	-
16	4,7	4,8	4,2	4,7	4,8	6,1	4,7	4,3
17	7,02	6,2	7,11	5,8	4,9	-	-	-
18	4,8	5,6	4,8	5,1	5,7	5,7	4,9	-