

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

AYLA WATANABE PEREIRA

**DESCRIÇÃO CITOMORFOLÓGICA DO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL
CANINO - TVTC E RESPOSTA CLÍNICA À QUIMIOTERAPIA.**

Belo Horizonte

2018

AYLA WATANABE PEREIRA

**DESCRIÇÃO CITOMORFOLÓGICA DO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL
CANINO - TVTC E RESPOSTA CLÍNICA À QUIMIOTERAPIA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de título de Mestra em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Ciência Animal.
Subárea: Patologia Clínica Veterinária.

Orientador: Paulo Ricardo de Oliveira Paes.

Belo Horizonte

2018

Pereira, Ayla Watanabe ,1987-

P436d Descrição citomorfológica do tumor venéreo transmissível canino – TVTc resposta clínica à quimioterapia /Ayla Watanabe Pereira. – 2018.

53f: il

Orientador: Paulo Ricardo de Oliveira Paes

Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Ciência Animal. Bibliografias: f: 49 a 53

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569

Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Ayla Watanabe Pereira

Às 09 horas do dia 27 de Abril de 2018, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado dos Cursos em 23/04/2018, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

DESCRICAÇÃO CITO-MORFOLÓGICA DO TUMOR VENEREO TRANSMISSÍVEL CANINO (TVTC) E RESPOSTA CLÍNICA À QUIMIOTERAPIA

Como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestre em Ciência Animal**, área de concentração em **Medicina e Cirurgia Veterinária**.

Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Prof. Paulo Ricardo de Oliveira Paes**, após informar o aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Aprovado	Reprovado
----------	-----------

Prof. Paulo Ricardo de Oliveira Paes

<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-------------------------------------	--------------------------

Prof. Rodrigo Santos Horta

<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-------------------------------------	--------------------------

Prof. Felipe Pierezan

<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-------------------------------------	--------------------------

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a): Aprovado

Reprovado

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar 07 volumes encadernados da versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 27 de Abril de 2018.

Assinatura dos membros da banca:



(Normas Regulamentares da defesa de dissertação no verso)

(Este documento não deverá conter rasuras e não terá validade sem assinatura e carimbo do Coordenador)

Dedico aos professores e colaboradores que proporcionaram a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Meu muito obrigada ao meu orientador, Professor Paulo, pelo exemplo de competência, pelos conselhos, pelo desprendimento, pela dedicação e pela amizade. Agradeço ao inestimável apoio emocional e profissional dos meus colegas, mas antes de tudo, amigos, Mariana e Rodrigo. Agradeço também aos professores que participaram do processo de desenvolvimento desta pesquisa, com muita paciência, generosidade, amizade, professores Fabíola, Felipe, Último, Lobão e Rubens.

Obrigada à Dra. Gleidice pelo exemplo de dedicação e amor à profissão e pela consideração com meu envolvimento nesta importante linha de pesquisa. Agradeço aos colegas que de alguma forma participaram do desenvolvimento desse trabalho e àqueles que também foram importantes pelo simples fato de estarem ao meu lado.

Em especial, agradeço à minha família e ao Daniel que tornam meus dias melhores e demonstram a capacidade de superação e de felicidade em todos os momentos. São meus exemplos de vida.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novos paisagens, e sim em ter novos olhos” (Marcel Proust, Romancista e Escritor Francês, 1871)

RESUMO

O tumor venéreo transmissível canino (TVTC) apesar de estar praticamente erradicado nos países desenvolvidos, ainda é uma doença endêmica nos países em desenvolvimento. Alguns estudos recentes indicam que diferentes padrões morfológicos do TVTC se correlacionam com a eficiência do tratamento clínico. O objetivo foi realizar a caracterização citomorfológica do TVTC e classifica-lo quanto aos padrões plasmocitóide, linfocitóide e misto, correlacionando com a resposta terapêutica. Para tal, foram avaliadas 61 amostras com diagnóstico citológico de TVTC nos tipos utilizando-se dois diferentes métodos de avaliação morfológica. Não foi observada diferença estatística entre os dois métodos nas leituras de lâmina. O TVTC do tipo linfocitóide foi o mais comumente observado (27/44%), seguido pelo tipo plasmocitóide (18/30%) e o tipo misto (16/26%). O número de sessões quimioterápicas para a regressão completa do TVTC variou de duas a sete, com média de 4,11 sessões. A análise de correlação dos três tipos celulares de TVTC com o número de sessões quimioterápicas necessárias para a regressão completa do tumor não resultou em diferença estatística. Entretanto, foi observada correlação moderada positiva entre o infiltrado de plasmócitos e o número de sessões de quimioterapia.

PALAVRAS-CHAVE: citologia, tumor, plasmocitóide, linfocitóide, quimioterapia, vincristina.

ABSTRACT

The canine transmissible venereal tumor (CTVT), is practically eradicated in developed countries, but remains an endemic disease. Some recent researches indicate that different morphological patterns of CTVT correlate with the efficiency of clinical treatment. The objective was to perform the cytomorphological characterization of the TVTC and classify it as to the plasmacytoid, lymphocytoid and mixed patterns, correlating with the therapeutic response. For this purpose, 61 samples with cytological diagnosis of CTVT were classified in the plasmacytoid, lymphocytoid and mixed types using two different methods of cellular evaluation. No statistical difference was observed between the two methods in the slide readings. Lymphocyte-type CTVT was the most commonly observed (27/44%), followed by plasmacytoid type (18/30%) and mixed type (16/26%). The number of chemotherapy sessions for complete CTVT regression ranged from two to seven, with an average of 4,11 sessions. The correlation analysis of the three CTVT cell types with the number of chemotherapy sessions required for complete tumor regression did not result in statistical difference. However, a moderate positive correlation was observed between the plasma cell infiltrate and the number of chemotherapy sessions.

KEYWORDS: cytology, tumor, plasmacytoid, lymphocytoid, chemotherapy, vincristine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exemplo de lâmina não utilizada (Fig. 1A) e lâmina analisada durante o estudo (Fig. 1B) em aumento de 1.000x. Na Fig. 1B destaca-se a melhor distribuição celular e qualidade para avaliação morfológica de cada célula, incluindo a definição da borda citoplasmática. Coloração do tipo Romanovsky rápida.	23
Figura 2	Fotografia de uma célula do tipo linfocitoide com núcleo em posição central. (aumento de 1.000x)	24
Figura 3	Diagrama esquemático de uma célula do tipo plasmocitóide com núcleo excêntrico – variação 1 (Fig. 3A) e célula plasmocitóide com ausência de citoplasma entre núcleo e periferia e 1/3 do seu perímetro contíguo à periferia da membrana citoplasmática (Fig. 3B). (aumento de 1.000x)	24
Figura 4	Diagrama esquemático de uma célula do tipo plasmocitóide com núcleo excêntrico – variação 2 (Fig. 4A). Célula plasmocitóide com formato redondo (Fig. 4B). Célula plasmocitóide de formato elíptico (Fig. 4C)	25
Figura 5	Células de aspecto plasmocitóide: A: Citoplasma escasso (seta) e citoplasma moderado, ao lado (Fig. 5A). B: Citoplasma abundante (Fig. 5B).	26
Figura 6	Células de aspecto linfocitóide: Citoplasma escasso (Fig. 6A). Citoplasma moderado (Fig. 6B). Citoplasma abundante (Fig. 6C).	26
Figura 7	Células de aspecto linfocitóide: A: Vacuolização ausente (seta) (Fig. 7A). B: Vacuolização discreta (seta) (Fig. 7B). C: Vacuolização intensa (seta) (Fig. 7C).	27
Figura 8	Células de aspecto plasmocitóide: A: Vacuolização ausente (seta) (Fig. 8A). B: Vacuolização discreta (seta) (Fig. 8B). C: Vacuolização intensa (seta) (Fig. 8C).	27
Figura 9	Exemplo de uma célula linfocitóide apresentando um nucléolo único apontado pela seta.	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Número de amostras e respectivo percentual dos tipos citomorfológicos do TVC estudados, a partir da leitura pelos métodos 1 e 2* e predomínio de células em diferentes pontos de corte (51%, 60% e 70%). *Método 1: padrão de leitura proposto por Amaral (2005) e Gaspar (2005) e Método 2: padrão de leitura proposto por Amaral (2005) e Gaspar (2005) modificado.	31
Tabela 02	Animais tratados com Vincristina e respectivo percentual dos tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível estudados em relação aos números de sessões necessárias para completa regressão do tumor, de acordo com a classificação citológica (Gaspar, 2005) (n=33).	41
Tabela 03	Animais que realizaram três ou menos (≤ 3) sessões quimioterápicas com Vincristina ou mais de três sessões (> 3) para regressão completa do TVTC e respectivo percentual dos tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível estudados, de acordo com a classificação citológica (Gaspar, 2005) (n=40).	41
Tabela 04	Animais que realizaram quatro ou menos (≤ 4) sessões quimioterápicas com Vincristina ou mais de quatro sessões (> 4) para regressão completa do TVTC e respectivo percentual dos tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível estudados, de acordo com a classificação citológica (Gaspar, 2005) e predomínio celular 60% (n=40).	42
Tabela 05	Animais que realizaram quatro ou menos (≤ 4) sessões quimioterápicas com Vincristina ou mais de quatro sessões (> 4) para regressão completa do TVTC e respectivo percentual dos tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível estudados, de acordo com a classificação citológica (Gaspar, 2005) e predomínio celular 51% (n=40).	44
Tabela 06	Animais que realizaram quatro ou menos (≤ 4) sessões quimioterápicas com Vincristina ou mais de quatro sessões (> 4) para regressão completa do TVTC e respectivo percentual dos tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível estudados, de acordo com a classificação citológica (Gaspar, 2005) e predomínio celular 70% (n=40).	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo geral	13
2.2. Objetivos específicos	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Seleção amostral	22
4.2. Análise citológica	22
4.2.1. Seleção do tipo citomorfológico	23
4.2.1.1 Método 1	23
4.2.1.2 Método 2	24
4.2.2 Determinação de características citomorfológicas e infiltrado inflamatório	26
4.3. Resposta clínica à quimioterapia	27
4.4. Análise estatística	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Dados amostrais	29
5.2. Classificação citomorfológica	30
5.2.1. Análise dos predomínios celulares propostos	31
5.2.2. Análise do tipo citomorfológico	32
5.2.3. Análise dos métodos de leitura e predomínios celulares propostos	33
5.3. Características citomorfológicas	34
5.3.1. Citoplasma	34
5.3.2. Vacúolos	35
5.3.3. Nucléolos	36
5.4. Avaliação do infiltrado inflamatório	37
5.5. Resposta clínica à quimioterapia	39
5.6. Hemograma	45
6. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

Frequentemente, o câncer aparece como resultado de mutações acumuladas em células ao longo do tempo de vida de um organismo, sendo atribuído a uma multiplicação normalmente clonal de células transformadas com um genótipo derivado a partir do próprio hospedeiro (Metzger et al., 2015). O Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTC) é uma neoplasia que acomete a espécie canina, também conhecido como sarcoma venéreo transmissível e sarcoma de Sticker (Woods, 2013). Teve sua origem elucidada conforme estudos de Murchison et al. (2014) onde mostra que a 11.000 anos atrás em uma população de cães isolada geneticamente e com baixa heterozigose, sob influência da radiação ultravioleta deu-se início à linhagem celular mais antiga existente, com aproximadamente 1,9 milhões de mutações genéticas e cariótipo distinto do cão.

Os cânceres clonais transmissíveis até então conhecidos pela literatura são, o TVTC e o tumor facial do demônio-da-tasmânia (TFDT). Ambos compartilham uma série de características comuns, se alastrando entre os hospedeiros através da transferência física das células cancerígenas (Murchison, 2009). São tumores capazes de disseminar facilmente entre os indivíduos e podem permanecer viáveis por longo período mesmo após a morte do hospedeiro original (Murchison, 2009). Entretanto, o prognóstico do TFDT é altamente desfavorável, sendo letal para os infectados, resultando em óbito em aproximadamente seis meses pela obstrução da cavidade nasal e/ou oral, diferentemente do prognóstico do TVTC, que é considerado favorável (Woods, 2013).

Recentemente, foi relatado um surto de leucemia fatal em bivalves marinhos que acarretou em enorme perda da população. A origem dessa doença ainda é desconhecida, mas, nos estudos realizados por Metzger et al. (2015), existem indícios de que o câncer se espalha entre indivíduos como uma célula clonal transmissível derivada de um único molusco original.

O TVTC é um excelente modelo para o estudo da interação entre a imunidade do hospedeiro e o crescimento tumoral. Além disso, por ser um tumor de fácil transplantação e crescimento rápido, propicia a oportunidade da utilização de marcadores de proliferação celular e estudo da cinética tumoral, acrescido de que sua regressão espontânea abre uma perspectiva para o estudo da morte celular por apoptose (Santos et al., 2005).

Mesmo sendo considerada uma neoplasia facilmente contagiosa (Raskin e Meyer, 2011), o sistema imune competente do hospedeiro poderá induzir a regressão do TVTC

espontaneamente. Embora doença metastática possa ocorrer raramente (Cowell et al., 2009), a neoplasia pode acometer o espaço intra-ocular (Amaral et al., 2012), região nasal, cavidade oral (Filgueira et al., 2013) e até órgãos internos (Park et al., 2006). Geralmente, o TVTC acomete principalmente a genitália externa de animais de ambos os sexos e, caso ocorra metástase, a morfologia celular encontrada na citologia é semelhante em todos os locais acometidos (Raskin e Meyer, 2011).

A transmissão do TVTC está associada à transplantação de células (Raskin e Meyer, 2011) na mucosa danificada por meio das barreiras do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), por coito, espirro ou lambida (Woods, 2013). A predominância do TVTC está relacionada à idade de maior atividade sexual, principalmente em climas tropicais e em países onde não ocorre um rigoroso controle da população de cães errantes (Costa, 2009; Raskin e Meyer, 2011).

Segundo Cowell et al. (2009) a célula do TVTC é o melhor exemplo do grupo das neoplasias de células redondas, sendo tipicamente as mais pleomórficas e esse grupo inclui algumas das neoplasias mais comumente encontradas na rotina da clínica de pequenos animais, por isso o reconhecimento específico torna-se imprescindível (Cowell et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi relatar as características citomorfológicas específicas das células de TVTC e, a partir disso, estabelecer um padrão de avaliação para os diferentes tipos de células encontradas e confirmar propostas de classificação de TVTC já estabelecidas divididas em dois padrões, sendo eles, plasmocitóide, misto e linfocitóide. Visto que, nos estudos de Amaral (2005) e Gaspar(2005) a partir da caracterização do padrão citomorfológico pode-se associar a uma resposta quimioterápica menos eficaz e até mesmo a resistência da neoplasia ao tratamento. Na sequência buscou-se observar a correlação dessas células com a resposta terapêutica dos animais a partir de levantamento de dados em fichas clínicas e tratamentos realizados nos animais com diagnóstico de TVTC e avaliar se os padrões morfológicos encontrados influenciam no número de aplicações quimioterápicas necessárias para remissão completa da neoplasia em cada animal. Essa constatação traduz-se em uma importante característica para auxiliar no prognóstico de tratamento do animal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar citologicamente as células do TVTC e caracterizar o padrão citomorfológico para correlação ao comportamento da resposta ao tratamento quimioterápico.

2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer novo padrão detalhado de avaliação para as células características do TVTC, a partir da observação de lâminas citológicas dos animais que possuam a neoplasia, para distinguir entre os padrões de células plasmocitóide e linfocitóide já existentes em literatura.
- Realizar avaliação das lâminas citológicas dos animais com TVTC a partir do padrão estabelecido pelo Laboratório de Patologia Clínica de Veterinária da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais) caracterizando cada amostra nos padrões do TVTC plasmocitóide, TVTC linfocitóide ou TVTC misto.
- Correlacionar o padrão citológico encontrado com o número de aplicações quimioterápicas necessárias para remissão completa do tumor.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O TVTC já foi encontrado em todos os continentes, entretanto, sua prevalência é maior nas áreas tropicais e subtropicais, particularmente nas Américas Central e do Sul, sul dos Estados Unidos, sul da Europa, Japão, China, Irlanda e em algumas partes da África (Woods, 2013).

São pouco frequentes na Inglaterra, Dinamarca e Suíça (Costa, 2009). Geralmente é detectado nas áreas urbanas onde há grande quantidade de cães errantes (Cowell et al., 2009). Já foi identificado também em outros canídeos (Woods, 2013).

O TVTC teve maior destaque na área de pesquisa somente após a realização do marcante trabalho realizado por Sticker, em 1905. Nele, o pesquisador se refere ao TVTC como um sarcoma ou linfossarcoma, que passou a ser chamado, então, de tumor de Sticker. Outros nomes designaram o TVTC ao longo dos anos, dentre eles: condiloma canino, granuloma venéreo, sarcoma infeccioso e linfossarcoma venéreo (Costa, 2009).

Em estudos iniciais, cogitava-se a respeito da possível participação de partículas virais na transmissão do TVTC e alguns autores chegaram a identificá-las erroneamente por meio da microscopia eletrônica. Esses experimentos foram contestados por estudiosos que atribuíram ao achado o aspecto de organelas celulares em degeneração (Costa, 2009).

Em 1963 foi realizada uma pesquisa em que 17 diferentes casos de TVTC foram estudados. Verificou-se que os TVTCs em estudo eram compostos de modo uniforme por uma célula-tronco, mas se diferiam dos tecidos caninos normais em relação ao número de cromossomos (59 contra 79) e à morfologia apresentada (Costa, 2009).

No estudo realizado por Murchison et al. (2014), a partir do sequenciamento de genoma de células de TVTC foi demonstrado que esse adquiriu cerca de 1,9 milhões de mutações, com evidências de que, ao longo de sua evolução, as células foram expostas a um baixo nível de luz ultravioleta. Sugere-se, então, que a origem do TVTC se deu a partir de um câncer ocorrido em lobos ou em raças antigas de cachorros com baixa heterozigose genômica, acerca de 10.000 a 15.000 anos atrás, provavelmente no período em que o animal foi domesticado (Woods, 2013; Murchinson et al., 2014).

Além de sofrer diversas mutações ao longo dos anos, o câncer gerado se disseminou e sobreviveu em vários continentes, demonstrando a robustez das células somáticas do cão (Murchinson et al., 2014). Além disso, amostras de TVTC, coletadas em diferentes regiões geográficas, apresentavam células com relevante estabilidade e cariótipos similares; ademais, estudos de genética molecular fornecem evidências de que essas células têm origem no mesmo ancestral (Woods, 2013).

Em geral, as células cancerígenas não são contagiosas ou transmitidas a outros indivíduos e, caso entrem em contato com o hospedeiro, serão reconhecidas imunologicamente com a consequente rejeição dessas pelo organismo, a partir de proteínas de superfície celular apresentadoras de antígenos polimórficas, particularmente o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em vertebrados (Mertzger et al., 2015). Entretanto, divergindo do encontrado usualmente, as células do TVTC foram utilizadas em um experimento realizado por Novinsky em 1876 que, com sucesso, transplantou o tumor em três cadelas, empregando técnicas de incisão e sutura, realizando o primeiro transplante de células cancerígenas bem-sucedido na área (Costa, 2009; Woods, 2013).

O método mais aceito de transmissão natural do TVTC é por meio da implantação de células viáveis em tecido escarificado. A transmissão experimental de TVTC por extrato livre de

células foi realizada por muitas vezes. Na literatura, há pesquisadores que obtiveram sucesso e outros que falharam em suas tentativas (Costa, 2009).

A transmissão do tumor pode ocorrer da forma mais usual, pelo coito, mas, também, transmite-se por outras maneiras em decorrência de hábitos como lambar, cheirar e morder. O TVTC pode ser encontrado nas cavidades oral e nasal e é possível o seu transplante a qualquer espécie susceptível, dentre essas, os lobos (*Canis lupus*) e os coiotes (*Canis latrans*) (Cowell et al., 2009; Woods, 2013; Murchinson et al., 2014).

O TVTC no hospedeiro hígido passa pelas fases de progressão e a regressão tumoral. Na fase de progressão, as células tumorais não expressam MHC (I e II) e os linfócitos estão presentes em número reduzido devido à secreção de citocina que inibe sua infiltração. Na fase regressiva já ocorre a expressão de MHC (I e II) por indução de citocinas e interleucinas, ocorrendo, assim, um aumento considerável de linfócitos infiltrantes (Murchinson, 2009). Assim, provavelmente, quanto maior a infiltração leucocitária no TVTC melhor o prognóstico (Costa, 2009).

A infiltração de leucócitos no TVTC foi descrita pela primeira vez em 1908 e, desde então, muitos relatos seguiram, sugerindo que a infiltração de leucócitos e macrófagos no TVTC seja uma reação de rejeição do hospedeiro ao tumor e, provavelmente, a ação de células inflamatórias induza a apoptose das células tumorais (Costa, 2009), atividade importante nesse processo e pouco estudada com relação ao TVTC (Santos et al., 2005). No estudo realizado por Mozos et al. (1996) foi demonstrada que a utilização de anti-soro CD3 pode ser útil para demonstrar e quantificar os linfócitos T em estudos sobre as fases de progressão ou regressão do TVTC.

Além das características degenerativas na fase de regressão, também se observa que as células tumorais sofrem alterações de formato, chegando a assumir um aspecto de fibroblastos (Costa, 2009). O período de ocorrência da fase progressiva varia de três a seis meses, na maioria dos cachorros, com exceção de animais que estejam sob condições gerais ruins, ou imunologicamente comprometidos (Woods, 2013).

Além da imunidade celular mediada, o TVTC estimula uma resposta imune humoral demonstrada por anticorpos contra os antígenos do TVTC. Em alguns estudos realizados existem sugestões da interferência do sistema imune desempenhando uma atividade de inibição do crescimento tumoral ou no aparecimento de metástases (Woods, 2013).

Em relação à regressão espontânea do tumor, os relatos na literatura do tumor de ocorrência natural após a instalação no hospedeiro são escassos, entretanto, há inúmeros relatos de

regressão espontânea de tumores transplantados (Costa, 2009). O tempo de redução do tumor geralmente ocorre em três meses após a implantação e raramente irá ocorrer depois de nove meses do tumor já instalado (Woods, 2013).

O aspecto macroscópico do tumor é de aparência nodular, com formação de um ou mais nódulos de formato irregular, friáveis e avermelhados, podendo apresentar ulcerações, com aspecto vegetativo ou pedunculado (Costa, 2009). O crescimento do tumor geralmente aparece de 2 a 6 meses do contato venéreo e pode crescer vagarosamente, inaparente e de forma não previsível por anos, ou crescer invasivamente e eventualmente se tornar maligno, formando metástases (Costa, 2009; Woods, 2013).

Mucosas e órgãos genitais de canídeos são os sítios mais comuns, sendo visto com mais frequência em pênis e prepúcio dos machos e na vulva e vagina das fêmeas (Costa, 2009). Também já foram relatados tumores localizados em região nasal, cavidade oral, terceira pálpebra (Filgueira et al., 2013) e intraocular, sem um foco de tumor simultâneo, detectável em localização genital, assumindo-se, portanto, tumor primário extragenital (Pereira et al., 2000; Amaral et al., 2012). Normalmente, o tumor pode estar acompanhado de drenagem de secreção serossanguinolenta, deformidades e odor intenso, algumas vezes com necrose e ulceração, chegando a haver exposição do tecido anormal (Costa, 2009).

No caso relatado por Filgueira (2010), o diagnóstico do tumor em cavidade oral caracterizou o quadro como uma forma extragenital e primária, com ulceração e hemorragia, além da perda de dentes. Nesse caso, foi cogitada a possibilidade do contágio natural do TVTC oral estar relacionado com o contato da mucosa bucal com a área perivulvar de uma cadela portadora da neoplasia, possivelmente durante o acasalamento, favorecendo a implantação de células do TVTC. Como relatado por Woods (2013), que alguns casos podem ter sido diagnosticados equivocadamente como metástase, já que outras áreas podem ser acometidas diretamente por lambedura, aspiração ou mordida, principalmente as cavidades nasal e oral, tecido subcutâneo e olhos.

O TVTC se apresenta frequentemente de forma localizada, mas metástases pode ocorrer com uma frequência de 5 a 17 %, podendo ocorrer nos linfonodos regionais e tonsilas, e também para tecido subcutâneo, pele, olhos, mucosa oral, fígado, baço, peritônio, hipófise, cérebro e medula óssea (Woods, 2013)

Desde 1989, com o objetivo de se esclarecer principalmente a histogênese do TVTC, emprega-se a imuno-histoquímica (Costa, 2009). Há algum tempo, já são utilizadas as proteínas lisozima

e alfa-1-antitripsina em amostras de TVTC e suas expressões sugerem a hipótese de que as células são de origem histiocítica (Mozos et al., 1996; Woods, 2013).

O estudo realizado por Mozos et al. (1996) confirma que as amostras de tecidos de TVTC rotineiramente processadas têm demonstrado um quadro variável de imunocoloração para lisozima e alfa-1-antitripsina. Dentre 25 amostras de TVTC utilizadas, a imunorreatividade da lisozima foi detectada apenas em 10, e a alfa-1-antitripsina (AAT) em 14. Sendo assim, deve-se atentar para o fato de que esses marcadores não são confiáveis para o diagnóstico de TVTC.

A citoqueratina é outra proteína também utilizada nos testes em células de TVTC. O resultado é sempre negativo, certificando que o TVTC não tem origem epitelial. Outra evidência que exclui uma origem epitelial para o TVTC foi a ausência do antígeno carcinoembrionário (CEA, *carcinoembryonic antigen*), um marcador de células de origem epitelial (Costa, 2009).

A vimentina e a proteína S-100 também foram alvo de muitas pesquisas. Elas se mostraram reativas neste tipo de tumor, apontando para uma origem mesenquimal do TVTC (Costa, 2009) falar da vimentina e citoqueratina antes de alfa-1 antitripsina e lisozima. O estudo realizado por Park et al. (2006) corrobora o encontrado na literatura, já que, por coloração imuno-histoquímica, as células neoplásicas do TVTC foram positivas para a lisozima e vimentina, mas foram negativas para citoqueratina.

A expressão de lisozima e alfa-1-antitripsina pode ser útil na diferenciação de alguns tumores de células redondas em cães, já que, quando é expressa, exclui linfomas, melanomas amelanóticos, carcinomas e mastocitomas pobremente diferenciados, podendo, então, ser empregadas no diagnóstico diferencial de TVTC (Costa, 2009).

O exame físico minucioso do animal é essencial para determinar possíveis locais de envolvimento, por exemplo, pele, subcutâneo, cavidades nasal e oral, olho e linfonodos regionais. O diagnóstico por imagem é normalmente desnecessário, exceto em casos de tumores invasivos, com destaque para a cavidade nasal. O perfil bioquímico e o exame de urina não revelam alterações relacionadas (Woods, 2013).

Embora o TVTC seja altamente contagioso entre os cães em geral, sua presença no hospedeiro não acarreta grandes danos à saúde desses animais. Sendo assim, o perfil hematológico de cães com TVTC transplantado ou de ocorrência natural não exhibe alterações graves na maioria das vezes (Costa, 2009). Entretanto, alguns dos possíveis fatores atribuídos às alterações nos parâmetros sanguíneos de cães com TVTC se deve a negligência dos proprietários nos cuidados higiênico sanitários dos cães e a localização anatômica dos tumores, que favorecem

traumatismos, contaminação bacteriana, perda crônica de sangue. Há alguns casos de associação com infestações parasitárias e a má nutrição desses cães (Costa, 2009).

Uma das formas utilizadas de diagnóstico do tumor aparente no hospedeiro é a reação em cadeia da polimerase (PCR), para diferenciar dos tumores de células redondas, principalmente em casos com metástases em múltiplos órgãos, como no encontrado por Park et al.(2006). Esta técnica pode ser aplicada em estudos retrospectivos, bem como prospectivos.

Tanto a PCR quanto as técnicas moleculares para analisar a sequência do elemento nuclear intercalar longo (LINE) podem ser utilizadas para identificar células tumorais (Raskin e Meyer, 2011). Entretanto, quando em localização genital ou extragenital, o diagnóstico preciso de TVTC primário ou metastático só pode ser firmado com auxílio de exame citológico ou histopatológico (Costa, 2009).

Dessa forma, a avaliação através de microscopia óptica de amostras citológicas, se tornou primordial para a confirmação do diagnóstico e, conseqüente definição da terapia a ser utilizada. Sem a correta definição do tipo celular neoplásico presente, o tratamento utilizado poderá ser voltado para outra afecção não neoplásica, induzindo o uso um medicamento, por vezes, desnecessário e dispendioso (Simermann, 2009).

Em comparação às análises de citologia e histopatologia constatou-se, no estudo realizado por Lima et al. (2013a), que as amostras citológicas permitiram melhor caracterização do tipo celular, avaliação dos critérios de malignidade e menor distorção da imagem, sugerindo a escolha por análise citopatológica para a classificação do TVTC.

O TVTC apresenta uma natureza friável, com ausência de aderência entre as células e a matriz de tecido conjuntivo. Sendo assim, a massa esfolia facilmente com a impressão tecidual, e os preparados citológicos costumam evidenciar grande quantidade de células neoplásicas (Cowell et al., 2009; Raskin e Meyer, 2011).

O exame citológico, então, evidencia uma população monomórfica de células grandes e redondas, variando de 12 a 24 micrometros de diâmetro (Cowell et al., 2009), individualizadas, com núcleo redondo, apresentando cromatina grosseira e um a dois nucléolos proeminentes e com citoplasma abundante, levemente basofílico contendo numerosos e distintos vacúolos (Raskin e Meyer, 2011). Considera-se a presença de vacúolos citoplasmáticos a característica mais marcante para diferenciação das células de TVTC em relação a outras células redondas (Cowell et al., 2009). Além dessas características, os núcleos podem aparecer excêntricos ou

centrais (Cowell et al., 2009) e as células podem ter alta relação núcleo:citoplasma (Costa, 2009).

As mitoses aparecem frequentemente e as formas anormais podem estar presentes, não sendo um parâmetro útil para prever o comportamento biológico do tumor. Pequenos linfócitos normais, poucos plasmócitos bem diferenciados e raramente histiócitos/macrófagos podem estar presentes, e eles tendem a aumentar em concentração durante a regressão espontânea do tumor, sendo a resposta imune localizada responsável pelo seu desaparecimento (Cowell et al., 2009) e, muitas vezes, a presença de células inflamatórias associadas ao tumor evidenciam contaminação bacteriana secundária (Raskin e Meyer, 2011).

A partir da observação das distintas características celulares do TVTC, foram realizados estudos acerca da possível distinção de grupos dentro da neoplasia já definida. Esses grupos foram definidos principalmente como padrão plasmocitóide e padrão linfocitóide (Amaral, 2005). O padrão plasmocitóide se caracteriza por mais de 60% das células presentes apresentando morfologia ovoide, citoplasma abundante e núcleo com localização excêntrica; o padrão linfocitóide, com mais de 60% das células apresentando morfologia arredondada, citoplasma escasso, a vacúolos acompanhando a periferia da célula, núcleo redondo com cromatina grosseira e presença de nucléolos (Amaral, 2005; Gaspar, 2005).

Existem diversas opções de tratamento para o TVTC (Costa, 2009), dentre essas, pode-se incluir a quimioterapia, utilizando principalmente a vincristina, a radioterapia e a excisão cirúrgica (Raskin e Meyer, 2011).

Em razão de recidivas, a cirurgia é raramente utilizada e elegida como método de tratamento; a radioterapia é considerada eficiente, mas acaba necessitando de instalações, técnicos e aparelhagem específica, apresentando uso restrito. A imunoterapia, radiofrequência, entre outras, são consideradas terapias alternativas com resultados muitas vezes promissores. Mas a quimioterapia, sem associações, tem-se apresentado mais efetiva (Costa, 2009).

Simermann (2009) realizou um estudo avaliando semanalmente a condição clínica dos pacientes tratados com o quimioterápico Vincristina e relatou que 94,4% dos animais apresentaram linfopenia e 22,2% dos cães apresentaram anemia, sendo ela explicada, também, pela natureza friável e altamente irrigada da neoplasia e atribuída à contínua secreção serosanguinolenta do tumor.

No estudo realizado por Gaspar (2005), considerou-se que os animais com TVTC padrão plasmocitóide apresentavam resistência ao tratamento com vincristina e, com o mesmo método

de avaliação, percebeu-se que as massas que não fossem primárias também poderiam expressar um potencial para resistência à quimioterapia.

Em um experimento, portadores de TVTC tratados com soro de cães imunes evidenciaram imunidade passiva. A presença da atividade do sistema imune tornou-se mais evidente quando outros cães receberam simultaneamente células tumorais por via subcutânea associado ao soro imune por via intravenosa e acabaram não desenvolvendo o tumor palpável no sítio da inoculação (Costa, 2009). Em outra avaliação experimental similar, cães imunocomprometidos com progressão contínua de TVTC e doença metastática não demonstraram regressão do tumor. Por outro lado, os cães que haviam se recuperado do TVTC possuíam imunidade soro-transferível para a reinfecção. Também foi visto que filhotes nascidos de cadelas expostas ao TVTC são menos suscetíveis à doença (Woods, 2013).

Para o tratamento quimioterápico do TVTC, de acordo com Silva et al. (2007), o sulfato de vincristina é a droga de escolha e demonstra ser efetivo na redução e cura, com reduzido efeito supressivo e taxas de recidiva. Alguns autores propõem a dose de 0,5 mg/ m² de superfície corporal, a cada sete dias, resultando em remissão completa do TVTC entre quatro e seis semanas de tratamento (Costa, 2009). Outros indicam a dose de 0,75 mg/m², sendo também efetiva para o tratamento do TVTC na maioria dos animais, apresentando uma baixa taxa (16,7%) de recidiva em estudo realizado por Brandão et al. (2002).

De acordo com Costa (2009) alguns casos de resistência ao tratamento quimioterápico com vincristina no TVTC foram estudados e essa condição foi atribuída à superexpressão da glicoproteína-p, presente na superfície celular responsável por promover a expulsão do quimioterápico de dentro da célula. Entretanto, o resultado demonstrou não haver diferença de expressão das glicoproteínas entre TVTC natural e o resistente à quimioterapia (Costa, 2009). Contudo, a continuidade do estudo da expressão da glicoproteína-p é importante para agregar benefícios ao animal em tratamento, aumentar a compreensão do mecanismo de resistência do tumor e possíveis modulações de sua resposta (Floréz et al., 2014).

Caso seja necessária quimioterapia, a resposta é favorável à remissão do tumor e uma pequena porcentagem de animais é resistente ao tratamento (Costa, 2009). Portanto, o prognóstico geral de TVTC é usualmente favorável (Woods, 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção amostral

A seleção das amostras foi realizada no setor de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG. Foram selecionados 61 casos de cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMG com diagnóstico citológico de tumor venéreo transmissível canino (TVTC), entre os anos de 2014 e 2018.

Para esses animais foi realizada a coleta de dados no sistema integrado de tecnologia de informação do Hospital Veterinário da UFMG, a partir das fichas de prontuário de onde foram obtidas informações referentes à caracterização dos tumores, tratamento realizado, raça, sexo, idade e exames complementares.

4.2. Análise citológica

As amostras citológicas de rotina, utilizadas para realizar o diagnóstico de TVTC dos animais selecionados, foram reavaliadas por microscopia óptica. Estas amostras foram obtidas por meio da técnica de imprint ou de punção aspirativa por agulha fina e coradas por coloração de Romanovsky, do tipo rápido (LaborclinR). Foi selecionada uma lâmina de cada animal que continha áreas adequadas de distribuição celular e coloração (controle de qualidade) por meio da varredura detalhada, com as objetivas de aumento de 10x, 40x e 100x, em uma ocular de 10x, para posterior análise (Fig.1).

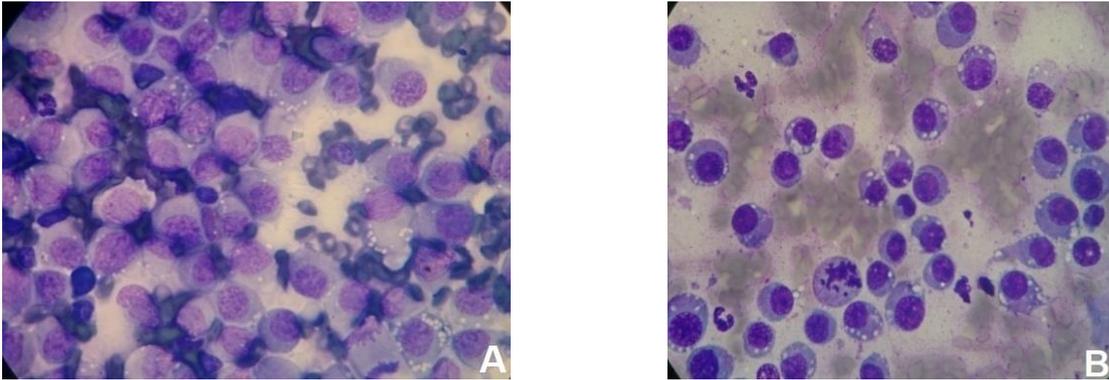


Fig.1: Exemplo de lâmina não utilizada (Fig.1A) e lâmina analisada durante o estudo (Fig.1B) em aumento de 1.000x. Na Fig.1B destaca-se a melhor distribuição celular e qualidade para avaliação morfológica de cada célula, incluindo a definição da borda citoplasmática. Coloração do tipo Romanovsky rápida.

4.2.1. Seleção do tipo citomorfológico

Para cada lâmina selecionada foi determinada a distinção entre os tipos celulares encontrados nas células do TVTC utilizando dois métodos. O primeiro método para a avaliação celular, doravante identificado como Método 1, foi proposto por Amaral (2005) e Gaspar (2005). O segundo método estabelecido para a avaliação, doravante identificado como Método 2, constituiu uma modificação dessa metodologia elaborada pelos autores anteriormente citados. Os dois sistemas de classificação foram executados por dois observadores cada, com as discordâncias eliminadas por consenso entre os citologistas.

4.2.1.1. Método 1:

As células foram classificadas como linfocitóides ao apresentar morfologia arredondada, citoplasma escasso e finamente granular, com vacúolos que acompanharam a periferia da célula, núcleo redondo e central com cromatina grosseira e um ou dois nucléolos proeminentes. As células foram classificadas como plasmocitóides ao apresentar morfologia ovóide, citoplasma mais abundante (menor relação núcleo:citoplasma), com núcleo localizado excentricamente.

4.2.1.2. Método 2:

A classificação das células como linfocitóide se deu quando foi visualizada toda a borda citoplasmática ao redor do núcleo, com o núcleo em posição central (concêntrico em relação à membrana) (Fig.2).

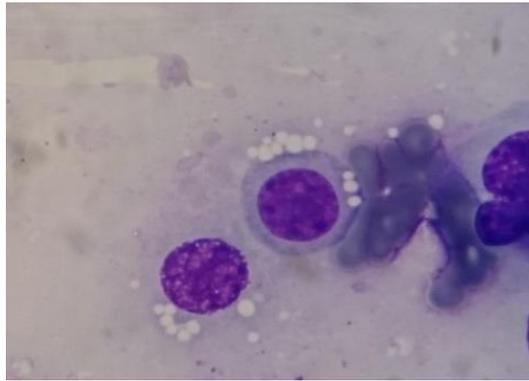


Fig. 2: Fotografia de uma célula do tipo linfocitóide com núcleo em posição central. (aumento de 1.000x)

As células classificadas como plasmocitóide foram encontradas em duas situações. Na variação 1 o núcleo celular é excêntrico de modo que no mínimo 1/3 do seu perímetro toque na periferia da membrana citoplasmática (posicionado de forma tangente à membrana) (Fig 3).

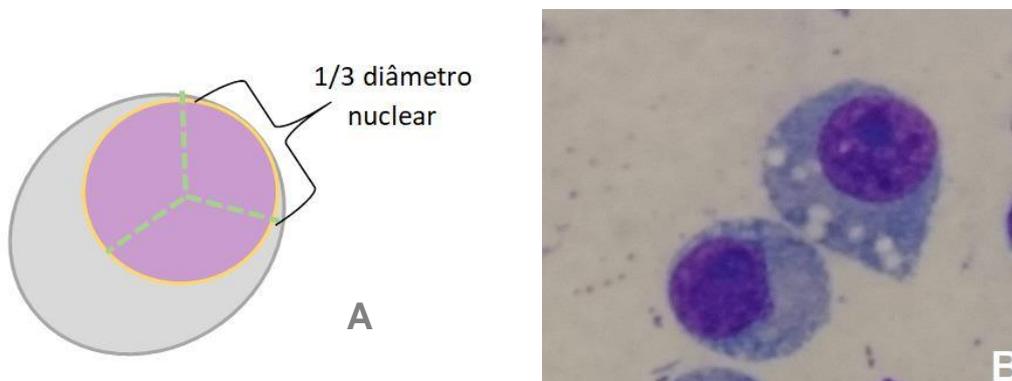


Fig. 3: Diagrama esquemático de uma célula do tipo plasmocitóide com núcleo excêntrico – variação 1 (Fig. 3A) e célula plasmocitóide com ausência de citoplasma entre núcleo e periferia e 1/3 do seu perímetro contíguo à periferia da membrana citoplasmática (Fig. 3B). (aumento de 1.000x)

Na variação 2 o núcleo é excêntrico, com no mínimo 1/3 do seu perímetro próximo à membrana. A faixa de citoplasma de maior dimensão, dada pelo deslocamento do núcleo, deve ser no mínimo, três vezes maior do que a da faixa menor, formada no sentido oposto (Fig 4).

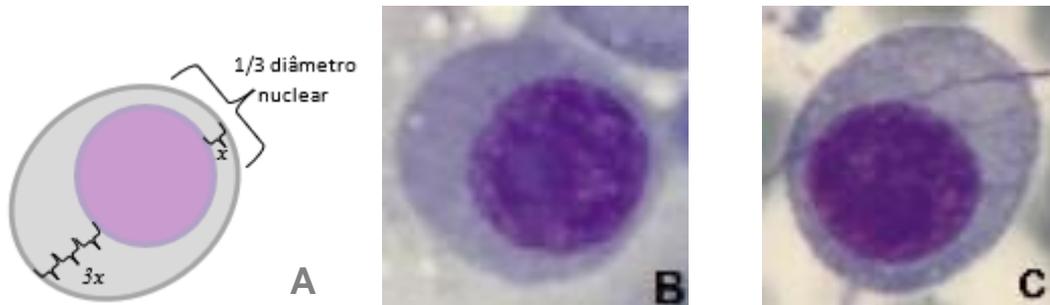


Fig. 4: Diagrama esquemático de uma célula do tipo plasmocitóide com núcleo excêntrico – variação 2 (Fig.4A). Célula plasmocitóide com formato redondo (Fig. 4B). Célula plasmocitóide de formato elíptico (Fig.4C)

Para a identificação de cada tipo celular foram avaliados no mínimo dez campos aleatórios e não sobrepostos em ambos os métodos. Em relação ao aumento microscópico, a análise de acordo com o Método 1 foi realizada em 400x, em concordância com o proposto por Amaral (2005) e Gaspar (2005) e, no Método 2 em 1.000x (objetiva de imersão). Foram analisadas no total 100 células de cada amostra citológica para a classificação do tipo celular predominante.

Na categorização preliminar do tipo celular predominante, foi empregado o parâmetro de corte de 60%, utilizado no Método 1. Neste parâmetro, após a contagem das 100 células, se 60 ou mais forem características do tipo linfocitóide, seria formado o Grupo Linfocitóide, chamado também de TVT "linfocitóide" e, o mesmo para as células com características do tipo plasmocitóide, formando o Grupo Plasmocitóide ou TVT "plasmocitóide". Caso a somatória da contagem de cada tipo celular não ultrapassasse 59%, seria categorizado como Grupo Misto ou TVT "misto", onde ficou considerado que existe uma celularidade mista entre os tipos celulares linfocitóide e plasmocitóide.

Adicionalmente, foram estabelecidos grupos com predomínio $\geq 51\%$ para ambos os tipos celulares, assim como, grupos com predomínio $\geq 70\%$ para ambos os tipos.

4.2.2. Determinação de características citomorfológicas e infiltrado inflamatório.

Definido o aspecto de cada célula pelo Método 2 foram identificadas as características celulares associadas/relacionadas às células de TVT, como citoplasma, vacúolos e nucléolos. O citoplasma foi categorizado em escasso ou moderado ou abundante (Fig 5 e 6). A vacuolização foi caracterizada em ausente ou discreta ou intensa, sendo considerada intensa a célula que possuía acima de cinco vacúolos (Fig 7 e 8). Por último, os nucléolos, classificados em ausente ou único ou múltiplo, complementando a abrangência das características citomorfológicas (Fig 9).

Além disso, nos campos avaliados, foram contabilizadas presença de mitoses, linfócitos, plasmócitos, binucleações, célula girino, contaminação bacteriana (bactéria intracelular) e infiltrado inflamatório neutrofílico.

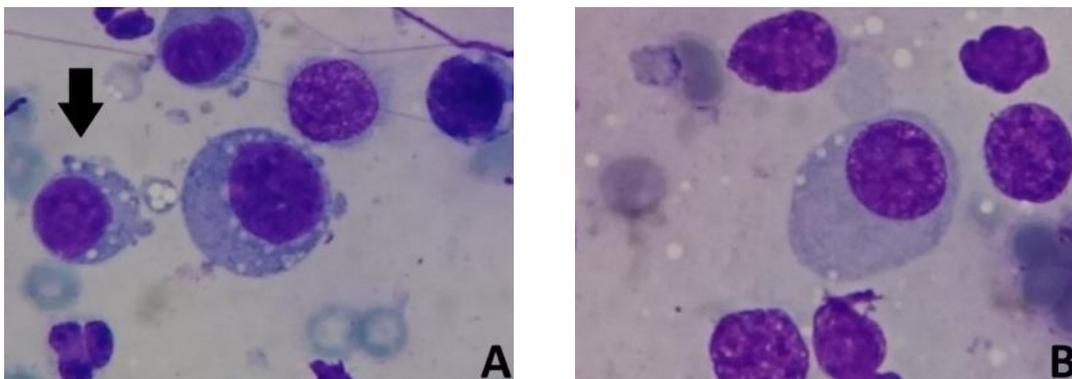


Fig.5: Células de aspecto plasmocitóide do Método 2: A: Citoplasma escasso (seta)e citoplasma moderado, ao lado (Fig.5A). B: Citoplasma abundante(Fig.5B).

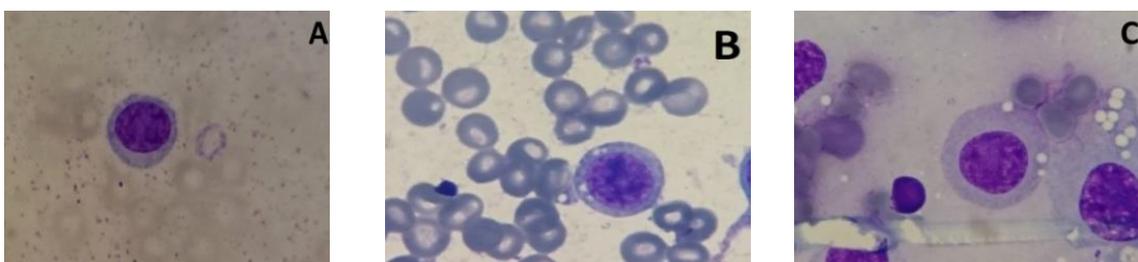


Fig. 6: Células de aspecto linfocitóide do Método 2: Citoplasma escasso (Fig.6A). Citoplasma moderado (Fig.6B). Citoplasma abundante (Fig.6C).

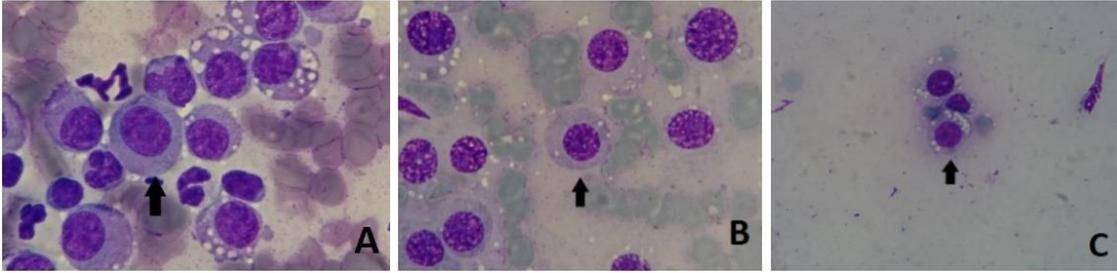


Fig. 7: Células de aspecto linfocitóide do Método 2: A: Vacuolização ausente (seta) (Fig.7A). B: Vacuolização discreta (seta) (Fig.7B). C: Vacuolização intensa (seta) (Fig.7C).

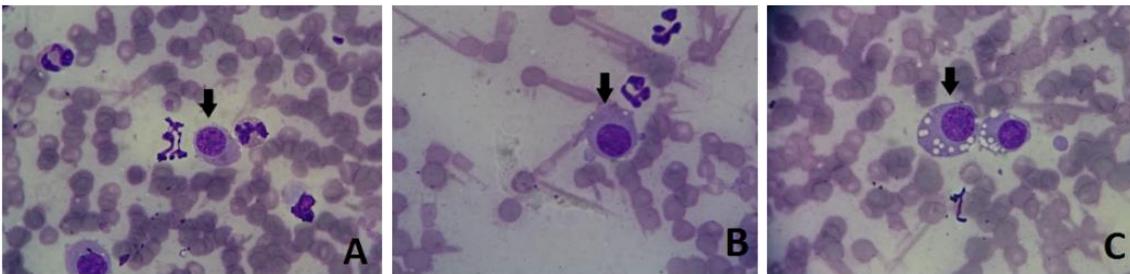


Fig. 8: Células de aspecto plasmocitóide do Método 2: A: Vacuolização ausente (seta) (Fig.8A). B: Vacuolização discreta (seta) (Fig.8B). C: Vacuolização intensa (seta) (Fig.8C).

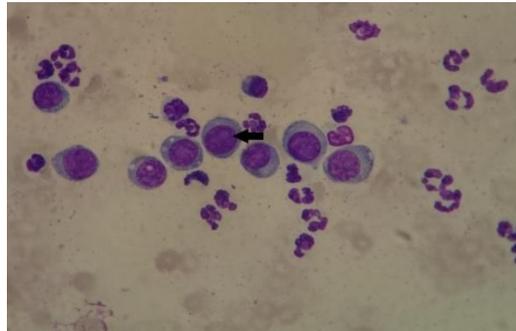


Fig.9. Exemplo de uma célula linfocitóide apresentando um nucléolo único apontado pela seta.

4.3. Resposta clínica à quimioterapia

Dentre os animais selecionados pelo estudo (n=61), 40 passaram por tratamento completo, sendo possível acompanhar o protocolo terapêutico e a resposta clínica pelo prontuário.

Em todos os casos o protocolo terapêutico constava de infusão semanal de sulfato de vincristina intravenosa, na dose de $0,75\text{mg/m}^2$ de superfície corporal, até a completa remissão do tumor. A exceção ocorreu para dois animais, onde houve mudança de protocolo terapêutico após a sexta sessão, sendo a sequência com vimblastina ou citostal. Também, outros cinco animais

realizaram após, ao menos quatro sessões com vincristina, a cirurgia para retirada do restante do tumor.

Foram avaliadas as quantidades de sessões de quimioterapia necessárias para a redução completa do tumor e os animais foram separados em dois grupos: aqueles que passaram por quatro ou menos sessões de quimioterapia e, dos animais com mais de quatro sessões de quimioterapia. Essa separação foi proposta para possibilitar a investigação da eficiência da resposta clínica e sua relação com o tipo citomorfológico (linfocitóide, plasmocitóide e misto) do animal encontrado nos diferentes métodos de avaliação.

4.4. Análise estatística

Inicialmente foi realizada uma estatística descritiva (frequências, médias e desvios-padrões) dos dados, relacionando-os com a descrição morfológica do TVTC. A estatística inferencial foi realizada no *software* GraphPadPrism versão 6.02. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$. O teste de Pearson foi utilizado para avaliar a correlação entre as variáveis estudadas. Para identificar se a correlação é positiva ou negativa e a intensidade da correlação, considerou-se o valor de rP , sendo fraca, moderada ou forte ($rP < 0,3$ como fraca; rP entre 0,3 e 0,7 como moderada e $rP > 0,7$ como forte).

Adicionalmente foi realizado o teste de Kruskal-wallis para comparar a mediana do número de sessões de quimioterapia em três grupos (linfocitóide, plasmocitóide e misto) e o teste de Mann-Whitney para dois grupos (linfocitóide, plasmocitóide). Para a avaliação dos grupos (≤ 4 e >4) e (≤ 3 e >3) foi realizada curva ROC e análise de regressão linear univariada. Foi realizado um teste de comparação de medianas de número de sessões entre plasmocitóide e linfocitóide com esquemas e porcentagens de predomínio celular.

Na análise dos hemogramas foi realizada a comparação das médias com ANOVA e Fischer, quando paramétrica/normal e medianas, utilizando Kruskal-wallis e Dunns, quando não paramétrica/não normal.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Dados amostrais

Na pesquisa apresentada, 33 animais possuíam a idade determinada na ficha de prontuário, sendo que a idade de acometimento do TVTC variou entre seis meses e 15 anos (média de 5 anos e meio e desvio padrão $5,5 + \text{ou} - x$). Nos estudos de Brandão et al. (2002), Amaral et al. (2004), Amaral (2005), Simermann (2009) a faixa etária de maior concentração ocorreu entre 3 a 5 anos, dentro de uma escala de ocorrências de 8 meses a 15 anos. Esse resultado demonstra a ampla faixa etária de animais com a capacidade de contrair o tumor.

Dentre os 61 animais avaliados, 59% eram fêmeas e 41% machos. Apesar de alguns pesquisadores não terem observado predominância de um determinado sexo na incidência do TVT entre a população canina acometida, alguns autores relatam maior incidência em fêmeas e outros, em machos (Costa, 2009). Apesar disso, em todos os trabalhos os valores absolutos dos grupos de machos e de fêmeas são próximos demonstrando que ambos sexos têm igual susceptibilidade do TVT (Woods, 2013). Dentre os estudos consultados, os que apresentaram predomínio da incidência em fêmeas foram, Amaral (2005) e Silva et al. (2007) enquanto nos trabalhos de Brandão et al. (2002) e Amaral et al. (2004) houve predomínio de machos.

Em relação à raça, os cães sem raça definida (SRD) foram os mais acometidos (80%). Dentre raças definidas (20%): quatro eram Pinscher, dois Poodles, um boxer, um Golden Retriever, um Labrador, um Pointer, um Shih-tzu e um Yorkshire. De acordo com Costa (2009), não há predisposição racial na ocorrência do TVT, embora alguns trabalhos realizados no Brasil cite o cão sem raça definida (SRD) como o mais acometido. Nos achados de Brandão et al. (2002), Amaral (2005), Silva et al. (2007), Simermann (2009) e Lima et al., (2013b), prevaleceram os animais sem raça definida; ratificando o resultado constatado no presente trabalho.

Os tumores variaram entre 0,5 a 6,5 centímetros (cm), com média de 3,6 cm, encontrando-se dentro da faixa de variação observada na literatura, que podem apresentar tamanhos pequenos, de 1 a 3 mm, até maiores, de 10 a 15 cm de diâmetro (Woods, 2013).

Todos os tumores desse estudo apresentavam superfície irregular, sendo alguns descritos com o aspecto de “couve-flor”, semelhante ao encontrado na literatura, que descreve o TVTC

inicialmente como pápulas hiperêmicas pequenas, que progridem formando nódulos papilares multilobulados como “couve-flor” ou uma proliferação de massas pedunculares (Woods, 2013).

A descrição da localização do tumor nas fichas foi relatada em 52 animais. Dentre esses, 79% apresentaram o tumor na região genital, 17% em região extragenital e 4% em ambas regiões, extragenital e genital, ou seja, multifocal. Dentre esses 52 animais, em dois animais foi constatada presença de metástase por diagnóstico citológico de linfonodo, um com massa em localização extragenital e o outro multifocal. A lesão normalmente se apresenta na genitália externa, mas pode ser encontrada em outras áreas (Cowell, 2009). Nesse estudo, o predomínio da ocorrência foi na região genital, tanto de machos quanto de fêmeas, confirmando a forma de transmissão prevalente por contato sexual, como apresentado na literatura (Brandão et al., 2002; Amaral et al., 2004; Amaral, 2005; Amaral et al., 2007; Silva et al., 2007 e Raskin e Meyer, 2011).

Mesmo que seja principalmente relacionado ao sistema genital externo, o aparecimento de massas similares unicamente extragenitais deve ser investigado com mais cautela. Devido à semelhança com outras afecções, o diagnóstico pode ser tardio, levando ao prognóstico reservado do animal (Filgueira, 2013). Por isso, torna-se fundamental a inclusão do TVTC como diagnóstico diferencial nas neoplasias, semelhante ao realizado na maioria dos casos desse estudo.

A praticidade e a eficácia da utilização da punção aspirativa por agulha fina ou por “imprint”, e a citologia como método de diagnóstico do tumor venéreo transmissível, foram comprovados no momento da visualização das lâminas em estudo. Simermann (2009) relatou que o uso da citologia aspirativa por agulha fina, aliado às características citomorfológicas próprias do TVT, excluíram a ocorrência de dificuldades no diagnóstico desta neoplasia.

5.2. Classificação citomorfológica

A leitura das lâminas, a partir das análises citológicas com confirmação dos casos de TVTC, resultou na identificação dos tipos celulares presentes e a consequente classificação do TVTC em plasmocitóide, linfocitóide e misto, segundo critérios anteriormente estabelecidos e apresentados no tópico “Material e métodos”. A classificação está apresentada na Tabela 01.

Tabela 01. Número de amostras e respectivo percentual dos tipos citomorfológicos do TVTC estudados, a partir da leitura pelos métodos 1 e 2* e predomínio de células em diferentes pontos de corte (51%, 60% e 70%). *Método 1: padrão de leitura proposto por Amaral (2005) e Gaspar (2005) e Método 2: padrão de leitura proposto por Amaral (2005) e Gaspar (2005) modificado.

PREDOMÍNIO CELULAR												
Tipo	51%				60%				70%			
	Mét.1		Mét.2		Mét.1		Mét.2		Mét.1		Mét.2	
Plasmocitóide	29	48%	32	52%	18	30%	20	33%	9	15%	11	18%
Linfocitóide	32	52%	29	48%	27	44%	21	34%	13	21%	14	23%
Misto	0	0%	0	0%	16	26%	20	33%	39	64%	36	59%
Total	61	100%	61	100%	61	100%	61	100%	61	100%	61	100%

5.2.1. Análise dos predomínios celulares propostos

A comparação da leitura entre os tipos indicou comportamento de variação diversa para cada predomínio celular. No predomínio celular a 51%, a leitura pelo Método 1 indicou maior quantidade de amostras tipo linfocitóide, enquanto que, de modo inverso, no Método 2 indicou maior quantidade de amostras tipo plasmocitóide, ambas com variação de apenas três amostras entre os tipos. Nesse estudo não houve amostra com a condição de 50% para cada tipo celular, por isso a ausência de amostras do tipo misto.

No corte de 60% ambos os métodos obtiveram predomínio do tipo linfocitóide, devido à transferência de amostras plasmocitóide para o tipo Misto. Porém, com esse corte, a variação da quantidade de amostras entre tipo linfocitóide e plasmocitóide foi maior no Método 1 com diferença de nove amostras e menor no Método 2 com apenas uma amostra. Com isso infere-se que, as nove amostras tipo plasmocitóide do Método 1 estavam com uma proporção de células plasmocitóides menor que 60% que implicaram na sua migração. Esta observação indica que o Método 2 tendeu a selecionar mais células plasmocitóide quando comparado ao Método 1.

No predomínio celular de 70% têm-se predomínio do tipo misto na leitura pelos dois métodos, em proporção inversa à dos outros tipos, sendo maior no Método 1. Comparando o tipo plasmocitóide com o linfocitóide ainda se observa presença de mais amostras tipo linfocitóide. Um estudo realizado por Amaral et al. (2004) sugeriu o predomínio celular à 70% como ponto de corte para definição do padrão e, em sequência, no estudo realizado por Amaral (2005) sugeriu o ponto de corte de 60%, mas ainda assim, segundo o autor, a definição da linha de corte do número de células para inclusão nos grupos foi relativamente arbitrária. O ponto de corte de 51%, então, foi proposto com o objetivo de apurar se, em diferentes proporções, poderia ser encontrada alguma relação estatística entre tratamento e os tipos de tumor.

5.2.2. Análise do tipo citomorfológico

O tipo linfocitóide foi o mais comum (27/44%), seguido pelos tipos plasmocitóide (18/30%) e misto (16/26%) indicando que os resultados do presente estudo não coincidiram com o pesquisado na literatura. Segundo estudos realizados na cidade de Botucatu (SP), foram avaliadas, no mínimo, 40 amostras, e evidenciou-se predomínio do tipo plasmocitóide, variando de 50 a 53%, seguido do tipo misto com 28 a 32% de variação e por último, o tipo linfocitóide variando de 18 a 20% (Gaspar et al., 2010; Amaral et al., 2007; Amaral, 2005; Gaspar, 2005). No estado de Goiás e na região de Bandeirantes (PR) avaliando 20 e 16 animais respectivamente, encontraram predomínio do tipo plasmocitóide variando de 43 a 45%, seguido de linfocitóide 30 a 38% e tipo misto 18 a 25% (Lima et al., 2013a; Filho et al, 2011).

Ainda no presente estudo, é possível avaliar na Tabela 01 que o tipo plasmocitóide apresenta-se em maior proporção no Método 2 quando comparado ao Método 1, para qualquer porcentagem do predomínio celular. Esse dado reforça a possibilidade do Método 2 selecionar uma quantidade maior de células plasmocitóides. O tipo linfocitóide permanece em maior proporção no Método 1 nos predomínios celulares de 51% e 60%, com inversão no de 70%. É esperado o aumento progressivo da quantidade de amostras do tipo misto presente nos cortes de 60% e 70%, visto que, elevando a porcentagem do predomínio celular selecionam-se amostras com predomínio evidente de apenas um tipo celular. Então, nas amostras do tipo plasmocitóide e linfocitóide, à medida que se eleva essa porcentagem, vão sendo reduzidas, sendo que no tipo plasmocitóide a redução é mais evidente quando comparada a redução das amostras do tipo linfocitóide.

Os tipos linfocitóide e plasmocitóide foram os que evidenciaram maiores variações de resultado, com no mínimo 10 % de diferença, entre as diferentes regiões identificadas. Essa diferença pode estar relacionada a fatores epidemiológicos, abordados de forma abrangente no estudo de Amaral (2005) e/ou da hipótese levantada por Filho et al. (2011) em que possa existir uma determinada linhagem de maior frequência em um local mais do que em outro.

5.2.3. Análise dos métodos de leitura e predomínios celulares propostos

Entre as porcentagens no Método 1, foi demonstrada correlação positiva fraca entre 51% e 60% e positiva moderada entre 60% e 70% e não houve correlação entre 51% e 70%

Entre as porcentagens no Método 2, foi demonstrada correlação positiva moderada entre 51% e 60% e entre 60% e 70%, mas também não houve correlação entre 51% e 70%.

Assim observou-se que, independente do método para o predomínio celular de 51% os resultados serão similares aos de 60%. Além da proximidade de resultado, a probabilidade de obter amostras do tipo misto é de 1%. Especificando o diagnóstico citológico entre padrão plasmocitóide ou linfocitóide.

Em contrapartida, na utilização do predomínio celular de 70%, ocorreram mais amostras do tipo misto, ainda com resultados próximos aos do corte de 60%. Amostras tipo plasmocitóide ou linfocitóide foram caracterizadas com uma quantidade superior de células do tipo morfológico predominante.

A comparação entre o Método 2 com corte de 51% e Método 1 com corte de 60% mostrou ter uma correlação positiva fraca, sendo assim, sem prejuízo da leitura citológica, é possível abordar o corte de 51% em qualquer um dos dois métodos no lugar do corte 60%.

Uma vez que as correlações encontradas entre o Método 2 com corte de 51% e o Método 1 com corte de 51%; e entre o Método 2 com corte de 51% e o Método 2 com corte de 60% demonstraram correlação positiva, ficou demonstrada a possibilidade de utilização de qualquer um dos métodos ou níveis de predomínio celular a 51% e 60% sem que haja prejuízo da definição do diagnóstico.

Para comparação entre os Métodos 1 e 2 de leitura, a partir dos três níveis estabelecidos: 51%, 60% e 70%, foi realizada análise estatística onde as correlações resultantes foram positivas e moderadas e ocorreu apenas uma correlação com tendência à significância, no predomínio

celular de 60%. A análise realizada demonstra que os dois métodos de avaliação empregados neste estudo, para identificação do tipo celular, chegaram a resultados similares.

5.3. Características citomorfológicas

A partir da definição do tipo celular em plasmocitóide ou linfocitóide pelo Método 2, em microscopia óptica, aumento de 1000x, caracterizou-se a quantidade de citoplasma como escasso ou moderado ou abundante; vacuolização perinuclear em ausente ou discreta (<5 vacúolos) ou intensa (≥ 5 vacúolos) e nucléolos ausentes ou únicos ou múltiplos, em cada tipo celular.

Em relação a forma apresentada pela célula do TVTC, Amaral (2005), Gaspar (2005) e Rocha et al., (2014) consideraram a célula linfocitóide de morfologia redonda, já Simermann (2009) encontrou formas variando de arredondada a ovoide. Nas células do tipo plasmocitóide, os trabalhos anteriormente citados foram unânimes em relação à morfologia ovoide da célula. Nesse estudo foram visualizadas tanto células linfocitóides quanto plasmocitóides com forma redonda ou ovoide, mas não foi realizada a distinção de proporções encontradas nesse parâmetro para os tipos celulares.

5.3.1. Citoplasma

A quantidade de citoplasma nas células do TVTC descrito nas literaturas varia de abundante (Raskin e Meyer, 2011) a moderada, com limites citoplasmáticos bem definidos (Cowell, 2009).

Na avaliação desse estudo, as células plasmocitóide e linfocitóide apresentaram citoplasma moderado em maior proporção, 97% e 84% respectivamente, seguido de citoplasma abundante e pequena proporção de citoplasma escasso. Nas células linfocitóides a quantidade de citoplasma abundante foi maior do que o encontrado nas células plasmocitóides, 10% e 2% respectivamente. O resultado encontrado é condizente ao descrito na literatura, mesmo com a pequena proporção de citoplasma abundante. Já os estudos de Amaral (2005), Gaspar (2005) e Rocha et al. (2014) observaram citoplasma escasso nas células linfocitóide e nas células plasmocitóides citoplasma abundante.

A observação da anisocariose remete, conseqüentemente, a uma avaliação subjetiva da quantidade de variação no citoplasma apresentado na amostra. Cowell (2009) descreveu, de forma geral, o TVT, apresentando anisocariose moderada a acentuada/intensa e, no estudo realizado por Lima et al. (2013a), a anisocariose foi um achado presente em 100% dos casos analisados, na maioria, em escala moderada. Esses indícios sugerem que as células do TVTC podem apresentar variações evidentes de concentrações citoplasmáticas.

5.3.2. Vacúolos

As células de TVTC possuem, como característica marcante, vários vacúolos citoplasmáticos bem evidentes, importantes na diferenciação entre as células dos outros tumores de células redondas (Raskin e Meyer, 2011). A quantidade de vacúolos varia de pequena a moderada, com tamanhos similares. Esses estão dispostos de forma linear ao longo da superfície interna da membrana celular (Cowell et al., 2009). Sendo considerada por Lapa et al. (2012) como um critério de malignidade das células de TVTC.

Lima et al. (2013a), em 20 amostras, encontrou vacuolização em 90%, sendo discreta e moderada em 75% e intensa em 15%, em apenas dois animais (10%) foi observada ausência de vacuolização.

Amaral (2005) supõe que os vacúolos sejam gotículas lipídicas em avaliação feita por microscopia eletrônica. Em avaliação em microscopia óptica foram encontradas duas amostras que não apresentavam vacúolos citoplasmáticos e, de 158, amostras foi resultante uma mediana geral de 85% de vacúolos perinucleares. No estudo, a vacuolização foi uma característica encontrada em 63% das células do TVTC. Dessas, 34% de forma discreta e 29% de forma intensa.

A partir da caracterização do tipo citomorfológico, foram encontradas diferenças com relação à vacuolização nesse estudo. Nas células plasmocitóide, os vacúolos foram ausentes em sua maioria (49% e 33% das células apresentavam vacuolização discreta e 18% intensa). As células linfocitóides apresentaram vacúolos em proporções similares, tanto de forma discreta (34%) quanto intensa (39%). Mas ainda assim é possível identificar uma quantidade considerável de células linfocitóides com ausência de vacúolos (27%).

Simermann (2009), Amaral et al. (2012) e Rocha et al. (2014) descreveram vacúolos nas células de padrão plasmocitóide, enquanto Amaral (2005) e Gaspar (2005) não descreveram esse achado. No padrão linfocitóide, todos observaram vacúolos no citoplasma, no entanto, apenas Rocha et al. (2014) graduou como poucos, apresentados na região periférica.

5.3.3. Nucléolos

De forma geral, a literatura classifica que os nucléolos são evidentes e, por vezes, são constatados um a dois proeminentes (Cowell et al., 2009; Raskin e Meyer, 2011). O padrão linfocitóide foi citado como o único a apresentar nucléolo (Amaral, 2005; Gaspar, 2005; Simermann, 2009, Rocha et al., 2014). A observação de nucléolos nas células desse estudo foi identificada para os tipos celulares linfocitóide e plasmocitóide, com predomínio de único nucléolo evidente.

No presente trabalho, a identificação do tipo celular em plasmocitóide ou linfocitóide, com as definições das características de citoplasma, presença de vacúolos e nucléolos evidenciaram uma correlação estatística. As correlações realizadas pelo método de Pearson foram significativas, demonstrando a propensão da célula linfocitóide a possuir mais citoplasma, vacúolo e nucléolo e da célula plasmocitóide a apresentar menor quantidade de citoplasma, vacúolos e nucléolos.

De uma forma geral, a estatística demonstrou que, possivelmente, se uma célula apresentar mais citoplasma, ela vai apresentar mais vacúolos e mais nucléolo. Esses dados são diferentes dos apresentados no estudo de Amaral (2005) que, avaliando o percentual de células vacuolizadas presentes não encontrou diferenças significativas entre os grupos plasmocitóide, linfocitóide e misto.

Gaspar et al. (2010) considera que conforme a avaliação da ausência ou presença de vacúolos citoplasmáticos, tamanho e forma celular e a relação núcleo: citoplasma, as células do TVTC podem ser classificadas em linfocitóide e plasmocitóide e levarem a consequente definição do padrão celular predominante. Entretanto, as características das células de TVTC se sobrepõem em relação ao tipo citomorfológico, ou seja, tanto as células plasmocitóides quanto as células linfocitóides podem apresentar características de citoplasma, vacuolização e nucléolos.

5.4. Avaliação do infiltrado inflamatório

A presença de infiltrado inflamatório foi observado em 57% dos 61 animais nesse estudo. O infiltrado inflamatório neutrofilico foi predominante em tumores com contaminação bacteriana evidente (Simermann, 2009), assim como o encontrado em 20 dos 35 animais nesse estudo. Lapa et al. (2012) observa no achado histopatológico de suas amostras além de neutrófilos, a presença de linfócitos em prevalência nos infiltrados inflamatórios.

Em um relato caso de um cão com metástase em vários órgãos, foi relatado em análise histológica que as massas neoplásicas genital e extragenital apresentaram concentração mínima a moderada de infiltrado perivascular de linfócitos, plasmócitos e raros macrófagos (Park et al., 2006).

Nove dos animais em que foram encontrados infiltrado inflamatório, a variação de tamanho foi de 0,5 cm a 6,0 cm, com média de 3,3 cm, entretanto, não foi observada qualquer relação significativa com a presença de infiltrado inflamatório na amostra, observáveis pela análise citológica, assim como encontrado por Amaral (2005).

O infiltrado infamatório predominante nesse trabalho foi o neutrofilico, provavelmente associado às ulcerações de superfície, já que a maioria da localização foi principalmente genital (78%), também foi observado infiltrado de plasmócitos e linfócitos, assim como encontrado por Amaral et al. (2004).

Foi encontrada presença de plasmócitos em 17 amostras das 61 analisadas, sendo a maioria de origem genital (88%). Dentre esses, dez animais apresentavam tratamento completo com Vincristina, e ao relacionar esse achado ao tratamento, foi visto que, foram necessárias mais de quatro sessões em cinco desses animais e quatro ou menos sessões nos outros cinco animais. Estatisticamente, houve uma correlação entre a quantidade de plasmócitos e a quantidade de sessões de Vincristina. Esse achado vai contra ao encontrado na literatura que relata que o infiltrado celular principalmente de linfócitos e plasmócitos pode estar associada a regressão espontânea, junto com processos de necrose e apoptose (Filgueira et al., 2013)

Em 44 amostras foi visualizado infiltrado de linfócitos, sendo que desses, 15 amostras continham infiltrado de linfócitos e plasmócitos. A localização genital foi a de maior predomínio dentre essas amostras (78%), sendo que nove animais passaram por tratamento com vincristina. Dessses, cinco precisaram de menos ou quatro sessões e quatro mais de quatro sessões.

Sete animais apresentaram associado infiltrado polimorfonucleares e mononucleares (linfócito e plasmócito). Dentre esses, cinco são linfocitóides e dois plasmocitóides e cinco possuem massa genital, corroborando o achado por Amaral (2005) que descreve que a presença desse tipo de infiltrado inflamatório foi significativo nas massas primárias, genitais e do padrão linfocitóide, sugerindo um melhor prognóstico. Entretanto, cinco desses animais possuíam informações sobre o tratamento e necessitaram de mais de quatro sessões de quimioterapia para regressão completa do tumor. Sendo assim, são animais que podem ser considerados com baixa capacidade de resposta ao tratamento.

Amaral (2005) descreve alguns critérios para avaliação e caracterização de possível malignidade da amostra, dentre eles, se encontram alterações citoplasmáticas e nucleares. Com isso, é possível obter maiores informações com relação ao tipo de TVTC que se relaciona com maior ou menor grau de malignidade. Dentre essas características, foi possível observar nas amostras nesse estudo a presença de células “em girino”, binucleação, e mitose, em adicional foram relatados processos de infiltrados inflamatórios presentes.

Amaral (2005) descreve que algumas características de malignidade apresentadas pela célula do TVTC ocorrem independente do padrão citomorfológico. Com exceção das células em girino, que foram observadas com maior frequência relacionadas ao tipo linfocitóide, enquanto nesse estudo, essas foram encontradas em um tipo plasmocitóide e um misto.

Lima et al. (2013a) relatou presença de células girino em 40% dos tumores no estudo, uma porcentagem alta quando comparado ao desse estudo, onde apenas três animais apresentaram célula “girino”.

As células “girino” são consideradas critério de malignidade nas amostras de TVTC e podem estar associadas a pressão entre células do próprio tumor (Gaspar et al., 2010). No presente estudo, apenas dois animais apresentaram célula girino na avaliação citológica e o tamanho tumoral maior que cinco centímetros. Esse achado pode ser associado à quantidade de células presente em um tumor de tamanho evidente (Gaspar et al., 2010).

Foram encontradas binucleações em cinco amostras dentro dos 61 casos avaliados, diferente do encontrado por Lima et al. (2013a) e Amaral (2005), onde a binucleação foi o critério mais frequente nas amostras analisadas.

Amaral (2005) relata que tumores de tamanho maior apresentaram maior frequência de células com binucleação, o que não foi visto nesse estudo. Dois animais que continham maiores proporções de binucleações possuíam, também, o tumor em localização extragenital.

Todos os tumores que apresentaram binucleação foram do tipo linfocitóide. Gaspar et al. (2005), entretanto, observa que essa característica é encontrada em todos os tipos citomorfológico. Estatisticamente, houve uma correlação positiva com a quantidade de binucleações encontrada nos cinco animais e a quantidade de células linfocitoides classificadas na amostra. Isso indica que quanto mais células linfocitoides forem encontradas na amostra, possivelmente, mais binucleações serão encontradas.

Apesar da mitose não ser considerada como forte indicador de malignidade para o TVT, já que a maioria é típica, Lima et al. (2013a) considerou a avaliação da característica tendo em vista que as células malignas se replicam com maior velocidade. No estudo de Lima et al. (2013a) foram observadas mitoses em 25% das amostras, sendo essas do tipo linfocitóide e do tipo plasmocitóide. No presente estudo foram encontradas mitoses típicas em 51% das amostras, sendo dez do tipo plasmocitóide, 16 linfocitóide e nove tipos misto. Da mesma forma, Amaral et al. (2004) observou figuras de mitose em todos os grupos de tumores, geralmente entre uma e três por campo de maior aumento (400x). Mitoses típicas, em tumores do tipo plasmocitóide foram encontradas em um relato de caso de TVTC intraocular descrito por Amaral et al. (2012) da mesma forma encontrada no presente trabalho.

Nas amostras avaliadas por Amaral (2005), as mitoses típicas foram um achado mais frequente do que as mitoses atípicas, mas no estudo realizado por Lapa et al. (2012), mitoses anormais foram observadas apenas nas primeiras avaliações citológicas, quando a quimioterapia estava começando a exercer seu efeito.

5.5. Resposta clínica à quimioterapia

Tumores que apresentam elevado grau de agressividade e variação na resposta à quimioterapia têm surgido nos últimos anos (Floréz et al., 2014), por isso é importante o diagnóstico de TVTC associado à classificação imediata do padrão favorecendo o início imediato da terapia antineoplásica, evitando retardo no tratamento e possíveis complicações (Amaral et al., 2012).

Com a classificação citomorfológica realizada dos 61 animais com diagnóstico TVTC deste estudo, apenas 40 (66%) foram submetidos ao tratamento quimioterápico por oncologistas, o que mostra que 33% dos animais não foram submetidos à quimioterapia ou não concluíram devidamente o protocolo indicado pelo clínico. Brandão et al. (2002) relatou dificuldades com casos que iniciavam o tratamento e desistiam ou não o retomaram após o diagnóstico e Lima et

al. (2013a) relatou as dificuldades em relação ao abandono do tratamento descrito em cinco casos, o que interfere na determinação da relação entre o padrão morfológico do TVTC e resultado terapêutico. Dentre os animais tratados, 33 foram submetidos ao protocolo sequencial de Vincristina até completa regressão do tumor.

Os 33 animais citados anteriormente foram separados em grupos de classificação pelo tipo morfológico de predomínio celular empregando o Método 1 e o Método 2 e com porcentagens determinadas (51%, 60% e 70%). O predomínio celular de 51%, tanto pelo Método 1 ou 2, não apresentou animais do tipo misto, sendo, então, para este caso, realizado o teste de Mann-Whitney e, para os demais utilizado o método Kruskal-wallis.

Os testes estatísticos foram utilizados para comparação da quantidade de sessões necessárias para regressão tumoral entre os grupos. Como resultado nenhum valor de p foi $<0,05$, ou seja, não houve diferença entre os grupos estabelecidos no estudo e a resposta ao tratamento de completa regressão tumoral, mesmo resultado obtido nos estudos realizados por Lima et al. (2013a) e Simermann (2009).

No que se refere ao protocolo de tratamento com quimioterápico Sulfato de Vincristina, em estudo realizado por pesquisadores da Universidade Federal de Goiás, 18 animais agrupados de acordo com a classificação citológica de TVTC (seis animais em cada) foram comparados os grupos com a quantidade de sessões de Vincristina necessárias para regressão completa do tumor. Nesse estudo, no Grupo Linfocitóide cinco de seis animais (83%) tiveram regressão completa do tumor antes de seis sessões de Vincristina, do Grupo Misto quatro animais (67%) tiveram regressão completa do tumor antes de seis sessões e do Grupo Plasmocitóide, apenas um animal (17%) teve o tratamento completo antes da sexta sessão. Assim, o autor concluiu que os animais do tipo plasmocitóide necessitam de um protocolo de no mínimo seis sessões de Vincristina, embora tenha sido relatado que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tipos citomorfológicos e o protocolo de tratamento (Simermann, 2009).

Contudo, no presente trabalho, dentre o Grupo Plasmocitóide, de dez animais, oito apresentaram regressão completa do tumor antes da sexta sessão de Vincristina (80%), no Grupo Linfocitóide, 14 de 16 animais (84%) apresentaram regressão completa do tumor antes da sexta sessão e, no Grupo Misto, seis de sete animais (86%) tiveram o tratamento completo antes da sexta sessão (Tabela 02).

Tabela 02. Animais tratados com Vincristina e respectivo percentual dos tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível estudados em relação aos números de sessões necessárias para completa regressão do tumor, de acordo com a classificação citológica proposta por Gaspar, 2005 (n=33).

Tipo	Número de sessões										Total	
	2		3		4		5		6		n	%
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Plasmocitóide	0	0%	2	20%	5	50%	1	10%	2	20%	10	100%
Linfocitóide	2	13%	2	13%	10	63%	0	0%	2	13%	16	100%
Misto	0	0%	5	71%	0	0%	1	14%	1	14%	7	100%

Os animais do Grupo Linfocitóide desse estudo e no realizado por Simermann (2009) apresentaram uma taxa similar de regressão tumoral anterior a seis sessões (84% e 83% respectivamente). Já no Grupo Plasmocitóide do presente estudo 80% dos animais apresentaram regressão completa em até seis sessões enquanto o estudo de Simermann (2009) indicou uma taxa de apenas 17% de regressão completa no grupo. Dentre os estudos avaliados, os resultados do tratamento dos animais do tipo linfocitóide apresentaram taxas semelhantes de resposta à terapêutica. Os resultados apresentados pelos animais com padrão plasmocitóide evidenciaram divergência entre os estudos, mesmo que ambos não tenham encontrado diferença estatística entre padrões citomorfológicos e tratamento.

Com o objetivo de ampliar as alternativas de relação entre tratamento e os tipos citomorfológicos, foi realizada outra proposta nova divisão entre os animais que realizaram tratamento onde foram incluídos os oito animais que passaram por, no mínimo, quatro sessões de Vincristina e que tiveram o protocolo terapêutico alterado por motivos diversos.

Os animais foram divididos em dois grupos, um grupo em que realizaram três sessões ou menos de quimioterapia com Vincristina (n=11) e outro em que realizaram mais de três sessões (n=29) para o tratamento do tumor (Tabela 03).

Tabela 03. Animais que realizaram três ou menos (≤ 3) sessões quimioterápicas com Vincristina ou mais de três sessões (> 3) para regressão completa do TVTC e respectivo percentual dos tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível estudados, de acordo com a classificação citológica (Gaspar, 2005) (n=40).

Tipo	≤ 3	%	> 3	%	Total
Plasmocitóide	2	14%	12	86%	14
Linfocitóide	4	24%	13	76%	17
Misto	5	56%	4	44%	9

Foi demonstrado na Tabela 03 que a minoria dos animais (14%) classificados com tipo plasmocitóide obteve resposta com três sessões ou menos de Vincristina, mesma resposta encontrada no tipo linfocitóide, onde poucos animais (24%) precisaram de menos de três sessões para regressão completa do tumor. No tipo misto a maioria dos animais teve resolução do tumor com menos de três sessões. Segundo Withrow et al. (2013) o TVTC requer no mínimo três sessões de tratamento com Vincristina, com resposta completa em 90% dos cães tratados. Entretanto, o grupo definido para três ou menos sessões demonstrou que a maioria dos animais desse estudo ultrapassou as três sessões necessárias para eliminação do tumor. Apesar da diferença demonstrada na tabela, a estatística para comparação dos grupos frente aos tipos citomorfológicos não apresentou significância.

Outros dois grupos montados separando animais que realizaram quatro sessões ou menos de quimioterapia (n=26), dos animais que realizaram mais de quatro sessões (n=14) para o tratamento do TVTC (Tabela 04).

Tabela 04. Animais que realizaram quatro ou menos (≤ 4) sessões quimioterápicas com Vincristina ou mais de quatro sessões (>4) para regressão completa do TVTC e respectivo percentual dos tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível estudados, de acordo com a classificação citológica (Gaspar, 2005) e predomínio celular 60% (n=40).

Tipo	≤ 4	%	> 4	%	Total
Plasmocitóide	7	50%	7	50%	14
Linfocitóide	14	82%	3	18%	17
Misto	5	56%	4	44%	9

Nessa divisão proposta ficou demonstrado que o grupo de animais classificados no tipo plasmocitóide obteve resposta com Vincristina, tanto com menos quanto com mais de quatro sessões, em proporções iguais. Provavelmente, o número de animais que realizaram mais de quatro sessões se manteve elevado devido à inclusão dos que realizaram outros procedimentos após as aplicações do quimioterápico. No tipo linfocitóide a maioria dos animais (82%) integrou o grupo onde o protocolo de até quatro sessões foi o ideal para regressão completa do TVTC. No tipo Misto o resultado permaneceu inalterado com a divisão de três ou quatro sessões.

Nos dois grupos selecionados nesse estudo, um de três sessões (≤ 3 ou > 3) e outro de quatro sessões (≤ 4 ou > 4), não houve diferença estatística entre os tipos citomorfológicos e os grupos de tratamento.

Esses resultados obtidos diferem do encontrado por Gaspar (2005) onde 17 dos 22 animais do grupo plasmocitóide (77%) precisaram de mais de quatro sessões para regressão completa do tumor, sendo essa resposta considerada como parcial pelos autores, enquanto que um número menor de animais nesse tipo (23%) respondeu bem a quatro sessões ou menos. Tanto no tipo linfocitóide, quanto no misto, o predomínio de animais foi observado no grupo onde o tratamento foi efetivo em até quatro sessões, sendo 58% no tipo linfocitóide e 67% no misto. Sendo assim, eles concluíram por meio de avaliação estatística significativa que o tipo plasmocitóide é mais sensível à quimioterapia com Vincristina quando comparado aos outros tipos.

O mesmo resultado foi apresentado por Gaspar et al. (2010), onde dos 21 animais tipo plasmocitóide, 17 (81%) precisaram de mais de quatro sessões para regressão completa do tumor e 4 (19%) precisaram de quatro sessões ou menos de quimioterapia com Vincristina. Os tipos linfocitóides e misto apresentaram resultados similares, com predomínio de animais no grupo com menos tratamentos, 7/64% e 7/70% respectivamente e menos de animais no grupo que precisou de mais de quatro sessões, 4/36% e 3/30%. Demonstrando maior quantidade de sessões para o tipo plasmocitóide.

Ao longo das avaliações de tratamento com diferentes predomínios celulares (Tabela 05 e 06) e métodos de avaliação (Método 1 ou Método 2) percebe-se que os animais do tipo linfocitóide apresentam uma constância em relação a quantidade de sessões para regressão completa do tumor. Assim, os animais do tipo linfocitóide demonstraram uma manutenção de resposta completa até quatro sessões enquanto que os resultados do grupo plasmocitóide não seguiram um padrão regular de resposta ao tratamento nessa pesquisa. Essa condição indica que mais estudos devem ser conduzidos para melhor compreensão do comportamento do padrão do tipo celular plasmocitóide.

Em acréscimo, Amaral et. al., 2007 pesquisou os tipos citomorfológicos em associação a características de localização e massas primárias e não primárias, indicando que tumores de localização genital possuem predomínio de células linfocitóides e massas não primárias, predomínio de células plasmocitóides. Sendo assim, é recomendável que estes parâmetros sejam associados às metodologias empregadas para a classificações do tumor.

Tabela 05. Animais que realizaram quatro ou menos (≤ 4) sessões quimioterápicas com Vincristina ou mais de quatro sessões (>4) para regressão completa do TVTC e respectivo percentual dos tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível estudados, de acordo com a classificação citológica (Gaspar, 2005) e predomínio celular 51% (n=40).

Tipo	≤ 4	%	>4	%	Total
Plasmocitóide	11	55%	9	45%	20
Linfocitóide	15	75%	5	25%	20
Misto	0	0%	0	0%	0

Tabela 06. Animais que realizaram quatro ou menos (≤ 4) sessões quimioterápicas com Vincristina ou mais de quatro sessões (>4) para regressão completa do TVTC e respectivo percentual dos tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível estudados, de acordo com a classificação citológica (Gaspar, 2005) e predomínio celular 70% (n=40).

Tipo	≤ 4	%	>4	%	Total
Plasmocitóide	3	43%	4	57%	7
Linfocitóide	3	75%	1	25%	4
Misto	20	69%	9	31%	29

Dois animais nesse estudo não apresentaram resposta esperada com tratamento somente à base de Sulfato de Vincristina indo de forma contrária ao encontrado por Simermann (2009), onde todos os animais de seu estudo obtiveram resposta satisfatória ao tratamento quimioterápico. Deve-se levar em consideração que os animais no estudo de Simermann (2009) não possuíam tumores extragenitais e no caso em estudo, apenas um possuía massa genital e o outro multifocal (genital e extragenital) com metástase em linfonodo.

O animal com metástase em linfonodo apresentou uma proporção de 60 células tipo linfocitóide e 40 células tipo plasmocitóide (leitura realizada da massa extragenital) e o animal com massa apenas genital apresentou uma proporção de 39 células tipo linfocitóide e 61 plasmocitóide (ambas leituras pelo Método.1). Esses achados divergem do concluído por Amaral (2007) apesar de, em sua análise descritiva, serem relatados dois animais com massa extragenital, metastática, mas do tipo linfocitóide.

A quantidade máxima de sessões de Vincristina para regressão completa do tumor realizada pelo grupo deste estudo foi de seis aplicações e, no mínimo, de duas sessões para seu desaparecimento completo. Sendo assim, a variação da utilização do tratamento quimioterápico ficou entre duas e seis sessões, enquanto outros estudos apresentaram variações de quatro a oito sessões (Amaral, 2005), quatro a seis sessões (Huppel et al., 2014), no mínimo de cinco aplicações em 80 casos, encontrado por Silva et al. (2007) e até casos extremos como o encontrado por Brandão et al. (2002) onde dez animais chegaram a completar de oito a doze aplicações para regressão do tumor. Esses dados demonstram que, com exceção dos animais que utilizaram outro protocolo de tratamento, os animais desse estudo, de uma forma geral e independente do padrão classificado, apresentaram resposta de cura satisfatória.

Para os 33 animais, desse estudo, que completaram o protocolo quimioterápico com Vincristina foi realizada uma análise estatística com objetivo de correlacionar a quantidade de sessões do quimioterápico à quantidade de células plasmocitóide ou linfocitóide encontradas em cada amostra, independentemente do método empregado na sua leitura, Método 1 ou Método 2. A análise estatística não demonstrou correlação. Assim, ficou demonstrada a possibilidade de que a presença de um tipo celular, em grande ou pouca quantidade, não tem relação com a quantidade de sessões realizadas.

5.6. Hemograma

O sulfato de vincristina na dose de 0,75 mg/m² de superfície corporal é a droga de preferência para o tratamento, aplicado a cada sete dias por via intravenosa obrigatória (Brandão et al., 2002; Amaral, 2005).

Silva et al. (2007) demonstrou ser efetiva a utilização da vincristina na redução e cura do TVTC, sem causar efeito supressivo e sem recidiva quando administrado num mínimo de cinco aplicações. O mesmo resultado foi encontrado nesse estudo onde foi aplicado o quimioterápico Vincristina em dose de 0,75 mg/m² em sessões realizadas a cada sete dias.

Com o objetivo da recuperação do tecido saudável entre um tratamento e outro, Withrow et al. (2013) recomendam que a administração dos fármacos citotóxicos seja realizada intercalando tempo entre as aplicações.

A avaliação dos efeitos do fármaco estabelece um critério para decisão da frequência da aplicação. O nadir (tempo onde ocorre a menor contagem de células do sangue durante a aplicação da quimioterapia) de cada quimioterápico, para a maioria dos fármacos é específico e coincide com o valor máximo de mielossupressão, momento que ocorre entre sete a dez dias após a administração. No entanto, é ideal que o intervalo entre aplicações seja o mínimo possível, não permitindo a expansão da população tumoral (Villalobos & Kaplan, 2007; Morris & Dobson, 2001).

Os animais desse estudo retornavam para casa após cada sessão de tratamento, contribuindo para a redução do estresse, similar ao relatado por Simermann (2009), que sugeriu que a permanência dos animais em ambiente doméstico, com pequena modificação em sua rotina, contribuiu para que estes fossem submetidos ao mínimo estresse possível. Os animais foram avaliados quanto à condição clínica e avaliação hematológica antes de cada sessão. Foram observados casos onde o proprietário não conseguiu descrever o histórico clínico correto do seu animal, possivelmente devido ao fato de que boa parte dos animais foi adotada, mesma condição encontrada por Amaral (2005), que também cita a inabilidade do proprietário em precisar a evolução ou estabilidade da massa neoplásica.

Dentre os 40 animais avaliados que realizaram tratamento, 55% (n=22) possuíam hemograma sequenciados relativos às sessões de quimioterapia. Com esses dados foi possível avaliar as condições clínicas dos animais ao longo dos efeitos do Sulfato de Vincristina. A anemia foi observada em 50% (n=11) dos animais, desses, 45% (n=5) animais permaneceram com anemia durante todo o tratamento e 55% (n=6) apresentaram anemia em momentos variados ao longo do tratamento.

Em três animais (50%) a anemia foi evidenciada nos primeiros hemogramas, sob efeito das primeiras aplicações do quimioterápico e dois animais (33%) desenvolveram anemia após o início da quimioterapia, porém recuperaram a sua condição clínica ainda em tratamento. Todas as anemias se apresentaram com classificação normocítica normocrômica, demonstrando que no momento do exame a medula óssea não apresentava recuperação dessa anemia. A análise estatística a respeito do volume globular (VG) não obteve nenhuma significância.

Segundo Rodaski & De Nardi (2006) a mielossupressão sob efeito do uso de vincristina implica em algumas alterações no hemograma que, raramente representam um problema, contradizendo o encontrado no presente estudo.

No entanto (Simermann, 2009) obteve menor quantidade de animais com anemia (22,2%), sendo atribuída essa característica à fragilidade tumoral e facilidade de sangramento na região devido sua alta irrigação sanguínea. Assim como Tinucci-Costa (1999) que caracteriza a presença da anemia ao próprio tumor e ao animal já que são cães predispostos por condições precárias de vida, por exemplo nutrição, contato com parasitas e maior possibilidade de contágio com outros animais.

Com o uso da Vincristina, quando se inicia um quadro de mielossupressão podem estar presentes, além do quadro de anemia, uma discreta leucopenia e trombocitopenia (Rodaski & De Nardi, 2006).

No estudo de Simermann (2009) também foi encontrado linfopenia em 94,4% (n=17) dos animais durante avaliação seriada, principalmente entre a terceira e sexta semana de tratamento. Foi encontrado no presente estudo apenas dois animais com linfopenia (10%), sendo que um apresentou essa condição ao longo de todo tratamento e o outro a partir dos primeiros efeitos do quimioterápico.

Também foi encontrado que 72,7% (n=16) dos animais desenvolveram neutropenia em momentos diferentes do tratamento com quimioterápico, apenas um animal desenvolveu neutrofilia após a primeira sessão com o quimioterápico, sendo que, em seguida desenvolveu a neutropenia. 38% (n=6) dos animais com neutropenia mantiveram essa condição durante todo o tratamento e 13% (n=2) dos animais apresentaram a neutropenia apenas após a primeira sessão do quimioterápico, retornando ao normal antes do término do protocolo de tratamento.

A trombocitopenia foi um achado em 22,7% (n=5) dos animais, diferente do observado nos 18 animais no estudo de Simermann (2009) que não obteve esse achado.

A análise estatística dos hemogramas dos animais, no presente estudo, ao longo do tratamento não evidenciou relações significativas, diferenças significativas, nas médias e medianas assim, pode-se inferir que a condição dos animais ao longo das sessões de quimioterapia se manteve estável. Hantrakul et al. (2014) descreve que o Sulfato de Vincristina possui rápida eliminação e logo, pouco acúmulo, resultando em bons efeitos clínicos se utilizado a cada sete dias. Esse resultado pode ser o motivo da ausência de relação estatística nos hemogramas sob efeito do quimioterápico.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente experimento, pode-se concluir que na análise citológica de casos de TVTC de cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMG em Belo Horizonte/MG

- Dentre os tipos citomorfológicos propostos por Amaral (2005) e Gaspar (2005), predomina o tipo linfocitóide.
- Estatisticamente, não há associação entre os tipos plasmocitóide, linfocitóide e misto com a quantidade de sessões de quimioterapia.
- O infiltrado plasmocitário está associado a um maior número de sessões quimioterápica para a remissão completa do TVTC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, A.S.; GASPAR, L.F.J.; SILVA, S.B.; ROCHA, N.S. Diagnóstico citológico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu, Brasil (estudo descritivo: 1994-2003). *Rev. Port. Ciên. Vet.*, v.99, n.551, p. 167-171, 2004.

AMARAL, A. S. *Tumor venéreo transmissível canino: critérios citológicos de malignidade e caracterização citomorfológica correlacionada a imunocitoquímica e lesão de DNA*. 2005. 228f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

AMARAL, A.S.; SILVA, S.B.; FERREIRA, I.; et al. Cytomorphological characterization of transmissible canine venereal tumor *Rev. Port. Ciên. Vet.*, v.102, n.563, p. 253-260, 2007.

AMARAL, A.V.C.; OLIVEIRA, R.F.; SILVA, A.P.S.M. et al. Tumor venéreo transmissível intraocular em cão: relato de caso. *Vet. e Zootec.*, v. 19, n.1, p. 779-785, 2012.

BRANDÃO, C.V.S.; BORGES, A.G.; RANZANI, J.J.T.; et al. Tumor venéreo transmissível: estudo retrospectivo de 127 casos (1998-2000). *Rev. Educ. Cont. CRMV-SP*, v. 5, n.1, p. 25-31, 2002.

COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DENICOLA, D.B. *Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos*. 3.ed. São Paulo: MedVet, 2009. 476p.

COSTA, M.T. Tumor venéreo transmissível canino. In: DALECK C.R.; DE NARDI A.B.; RODASKI S. *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Roca, 2009, cap. 35, p.539-555.

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

FILGUEIRA, K. D.; PEIXOTO, G.C.X.; FONSECA, Z.A.A.S.; PAIVA, A.L.C. Tumor venéreo transmissível canino com múltiplas localizações extragenitais. *Acta Scien. Vet.*, v. 41, n 1, p. 1-6, 2013.

FLOREZ, L.M.M.; FÊO, H.B.; ROCHA, N.S. Tumor venéreo transmissível canino: expressão dos genes MDR-1, TP53 e da família Bcl-2 e suas implicações no comportamento biológico e terapêutico. *Rev. CES Med. Zootec.*, v. 9, n. 2, p. 281-294, 2014.

FLÓREZ, L.M.M., PEDRAZA-ORDÓNEZ F., MONTEIRO, S., et al. Clinical and cytological staging of transmissible venereal tumour at the Botucatu Veterinary Hospital. *Veterinaria y Zootecnia*. v.7, p. 71-91, 2013.

GASPAR, L. F. J. *Caracterização citomorfológica do tumor venéreo transmissível canino correlacionada com danos citogenéticos, taxa de proliferação e resposta clínica à quimioterapia*. 2005. 164f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

GASPAR, L.F.J.; AMARAL, A.S.; SILVA, S.B.; ROCHA, N.S. Imunorreatividade à glicoproteína-p nos diferentes tipos citomorfológicos de tumor venéreo transmissível canino. *Vet. Foco*, v. 6, n. 2, p 140-146, 2009.

HANTRAKUL, S., KLANGKAEW, N., KUNAKORNSAWAT, S., et al., Clinical pharmacokinetics and effects of vincristine sulfate in dogs with transmissible venereal tumor (TVT). *J Vet Med Sci*. V.76, n.12, p:1549-53, 2014.

HUPPES, R.R., USCATEGUI, R.A.R., NARDI, A.B., Tumor venéreo transmissível (TVT): Estudo retrospectivo de 144 casos. *ARS Veterinária*, v.30, n.1, p. 13-18, 2014.

LIMA, C.R.O.; RABELO, R.E.; VULCANI, V.A.S. et al. Morphological patterns and malignancy criteria of transmissible venereal tumor in cytopathological and histopathological exams. *Braz. J. Vet. Anim. Sci.*, v. 50, n. 3, p. 238-246, 2013a.

LIMA, T.B.; MARINHO, P.V.T.; LIRA, R.N. et al. Apresentação atípica de tumor venéreo transmissível cutâneo em um cão. *Vet. e Zootec.*, v. 20, n. 1, p. 57-61, 2013b.

Ministério da Saúde. Instituto nacional do câncer (INCA). ABC do câncer - Abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: Inca, 2011. 128p. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/control_cancer. Acesso em: 15 set. 2015.

METZGER M.J., REINISCH, C., SHERRY, J., et al. Horizontal Transmission of Clonal Cancer Cells Causes Leukemia in Soft-Shell Clams. *Cell*, v. 161, p. 255–263

MORRIS, J., & DOBSON, J. Small Animal Oncology. Londres: Blackwell Science, 2001.314p.

MOZOS, E.; MÉNDEZ, A.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C., et al. Immunohistochemical Characterization of Canine Transmissible Venereal Tumor. *Vet. Pathol.*, v.33, p. 257-263, 1996.

MURCHISON, E.P. Clonally transmissible cancers in dogs and Tasmanian devils. *Oncogene*, v.27, p.19-30, 2009.

MURCHISON, E.P.; WEDGE, D.C.; ALEXANDROV, L.B.et al. Transmissible dog cancer genome reveals the origin and history of an ancient cell lineage. *Science*, v. 343, p.437-440, 2014.

PARK, M. S.; KIM, Y.; KANG, S. Y. O.; et al. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. *Journ. Vet. Diagn. Invest.*, n.18, p.130-133, 2006.

PEREIRA, J. S.; SILVA, A. B. F.; MARTINS, A. L. B.; et al. Immunohistochemical characterization of intraocular metastasis of a canine transmissible venereal tumor. *Vet. Ophthal.*, v. 3, n.1, p.43-47, 2000.

RASKIN, R.E.; MEYER, D.J. *Citologia Clínica de Cães e Gatos*.2.ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2011, 450p.

ROCHA, N.S.; TREMORI, T.M.; CARNEIRO, J.A.M. Fine Needle Aspiration Cytology in the Diagnosis of Canine Cutaneous Transmissible Venereal Tumor-Case Report. *Open Journ. of Vet. Med.*, v. 4, p. 204-209, 2014.

RODASKI, S.; DE NARDI, A. B. *Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos*. São Paulo: Medvet Livros, 2007. p.308

SANTOS, F.C.A.; VASCONCELOS, A.C.; NUNES, J.E.S; et al. O tumor venéreo transmissível canino - aspectos gerais e abordagens moleculares (revisão de literatura). *Bioscien. Journ.*, v. 21, n. 3, p. 41-53, 2005.

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

SIMERMANN, N. F. S. *Sulfato de vincristina no tratamento do tumor venéreo transmissível frente à caracterização citomorfológica*. 2009. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

VILLALOBOS, A., KAPLAN, L. *Canine and Feline Geriatric Oncology: Honoring the Human-Animal Bond*. Iowa: Blackwell Publishing, 2007. p.381

WOODS, J. P. Canine transmissible Venereal Tumor. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. 5.ed. St Louis (MO): Saunders. 2013