

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TOXICIDADE DO CLORIDRATO DE DOXORRUBICINA NA
DOSE CUMULATIVA DE 120mg/m², EM CADELAS COM
TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL**

Rafaela Bortolotti Viéra
Médica Veterinária

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TOXICIDADE DO CLORIDRATO DE DOXORRUBICINA NA
DOSE CUMULATIVA DE 120mg/m², EM CADELAS COM
TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL**

Rafaela Bortolotti Viéra

Orientador: Profº Dr. Andrigo Barboza De Nardi

Coorientadora: Profª. Dra. Annelise Carla Camplesi

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

2015

Viéra, Rafaela Bortolotti
V665t Toxicidade do cloridrato de doxorrubicina na dose de 120mg/m²,
em cadelas com tumor venéreo transmissível / Rafaela Bortolotti
Viéra. -- Jaboticabal, 2015
x, 78 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Andriago Barboza De Nardi
Banca examinadora: Mirela Tinucci Costa, Jorge Luiz Costa Castro
Bibliografia

1. Quimioterapia antineoplásica. 2. Antraciclinas. 3. Efeitos
adversos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

RAFAELA BORTOLOTTI VIÉRA – Nascida em Ribeirão Preto, no dia 20 de Março de 1987, filha de José Luis Viéra e Luzia Cleusa Bortolotti. Formou-se em Medicina Veterinária em janeiro de 2013 pelo Centro Universitário Barão de Mauá. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica, pesquisando sobre o uso do fator estimulante de colônia de granulócitos na contagem neutrofílica de cães saudáveis sob orientação da Prof^a. Dr^a. Ana Paula Massae Nakage Canesin. Ingressou no mestrado em março de 2013 pelo programa de Cirurgia Veterinária com ênfase em oncologia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, orientada pelo Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi. Atua de forma voluntária no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” – UNESP, Jaboticabal.

“Deixe algum sinal de alegria, onde passes”.

(Chico Xavier)

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a todos os pacientes que lutam
contra o câncer.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu Orientador, Professor Andriago Barboza De Nardi

Meu maior exemplo dentro da universidade. Serei eternamente grata pela confiança empenhada em mim e pelos valiosos ensinamentos sempre passados com paciência e tranquilidade e que com toda certeza os carregarei por toda vida.

A minha Coorientadora, Professora Annelise Carla Camplesi

Expresso aqui minha grande admiração tanto como pessoa quanto pela professora exemplar que é. Agradeço por todo aprendizado proporcionado nesses dois anos e que com certeza acrescentaram somente coisas boas tanto na minha vida pessoal quanto profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, pela vida e por sempre iluminar meus caminhos, me fazendo enxergar coisas boas mesmo nos momentos de dificuldade;

A minha mãe, pessoa mais importante da minha vida, meu maior exemplo de força e determinação, me apoiou no meu sonho mesmo sabendo que a caminhada seria difícil, me ensinou a lutar pelos meus objetivos com esperança e honestidade sempre, uma vida só seria pouco para retribuir tudo que faz por mim;

Ao meu pai, que agora lá de cima sei que está me guiando e me protegendo. Deixou-me a herança mais valiosa que um ser humano pode ter, a educação, o caráter e a honestidade através do seu exemplo;

Aos meus irmãos e sobrinhos pelo apoio e pela nossa união que tornam os momentos simples da vida no que considero verdadeira felicidade;

A professora Mirela Tinucci Costa, um grande exemplo de mulher e de profissional, uma pessoa muito iluminada, que por onde passa transmite o conhecimento;

A professora Marcia Sobreira, pela grande ajuda na execução do projeto e pelas valiosas considerações;

Ao professor João Ademir, pela atenção e grande ajuda nas análises estatísticas deste projeto;

Ao professor Jorge Castro, pelo aceite em fazer parte da minha banca de defesa, contribuindo muito para este projeto;

Ao amigo e parceiro de experimento, Giovanni Vargas Hernández por todo conhecimento que me proporcionou através da sua experiência, deixo aqui expressa minha admiração por você;

A Aline Araki e Juliana Assumpção, por fazerem parte da equipe deste projeto e pelas longas madrugadas que passamos juntas fazendo coletas;

A toda equipe do Serviço de Oncologia Veterinária da Unesp, Oscar, Giovanna, Lívia, Paulo, Naziltom, Marília, Ana e Josi. Agradeço pela amizade e pela troca de experiências entre nós. Sou muito feliz em ter todos vocês fazendo parte desta fase tão importante da minha vida;

A toda equipe do laboratório de patologia clínica do hospital veterinário Governador Laudo Natel, pela realização dos exames e pela disposição em ajudar sempre que foi necessário;

Ao Dr. Fabio Nelson Gava e toda equipe do Serviço de Cardiologia Veterinária da Unesp, pelas avaliações cardíacas realizadas nos pacientes deste projeto;

A residente Mariana Tiai Kihara, e toda equipe do serviço de radiologia da Unesp pela realização das ultrassonografias durante este projeto;

A dona Izilda, que durante todo o experimento ajudou a cuidar com carinho dos cães alojados no canil;

As minhas grandes amigas, que apesar de não nos vermos mais com tanta frequência, nada muda entre nós, Jéssica Barros, Marília Andrade, Natália Rosifini e Thaisa Bertolini, vocês são muito especiais;

A todos os professores, funcionários, pós-graduandos e residentes do Hospital Veterinário da FCAV-UNESP- Jaboticabal, pela ajuda e amizade;

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal e a pós-graduação, pela oportunidade;

A todos os cães que fizeram parte deste projeto;

A todos os animais;

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para este projeto;

Aos meus cachorros, Logan *in memorian*, Shrek e Felipe, que completam a felicidade da minha vida;

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida durante o mestrado.

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO ÉTICA	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE QUADROS.....	ix
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	2
1.2.1 Cloridrato de Doxorrubicina.....	2
1.2.1.1 Mecanismo de Ação.....	2
1.2.1.2 Farmacocinética	3
1.2.1.3 Citotoxicidade	3
1.2.1.4 Toxicidade Hematológica	4
1.2.1.5 Toxicidade Gastrointestinal	4
1.2.1.6 Hepatotoxicidade.....	4
1.2.1.7 Cardiotoxicidade.....	5
1.2.1.8 Reações de Hipersensibilidade	6
1.3 REFERÊNCIAS.....	7
CAPÍTULO 2	11
RESUMO	11
ABSTRACT	12
2.1 INTRODUÇÃO	13
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	14
2.2.1 Instalações	14
2.2.2 Protocolo Experimental	15

2.2.3 Avaliação Hematológica Periférica.....	18
2.2.4 Avaliação Hematológica Central	18
2.2.5 Avaliação Bioquímica Sérica	19
2.2.6 Avaliação dos Efeitos Adversos	19
2.2.7 Avaliação da Resposta Tumoral.....	20
2.2.8 Análise Estatística	20
2.3 RESULTADOS.....	21
2.3.1 Avaliação Hematológica Periférica.....	21
2.3.1.1 Série Vermelha e Plaquetograma	21
2.3.1.2 Série Branca.....	22
2.3.2 Avaliação Hematológica Central	23
2.3.3 Avaliação Bioquímica Sérica	24
2.3.4 Citotoxicidade Tumoral.....	25
2.3.5 Avaliação Cardíaca	28
2.3.6 Efeitos Adversos Inespecíficos.....	29
2.4 DISCUSSÃO	30
2.5 CONCLUSÃO	37
2.6 REFERÊNCIAS.....	38
APÊNDICES	43
APÊNDICE A	43
APÊNDICE B	45
APÊNDICE C	46
APÊNDICE D	47
APÊNDICE E	51



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 015013/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Determinação da toxicidade do cloridrato de doxorrubicina no tratamento de cães com tumor venéreo transmissível"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 03 de setembro de 2014.

Jaboticabal, 03 de setembro de 2014.

Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT: Alanina aminotransferase
AST: Aspartato aminotranferase
DOX: Doxorrubicina
EDTA : Ácido etileno diaminotetracético
FA: Fosfatase alcalina
g/dL: Gramas por decilitro
kg: Quilograma
LIN: Limite inferior da normalidade
LSN: Limite superior da normalidade
m²: Metros quadrados
mg: Miligramas
mg/dL: Miligramas por decilitro
mL: Mililitros
PT: Proteína total
RC: Remissão completa
RP: Remissão parcial
T_{1/2}: Tempo de meia vida
TVT: Tumor venéreo transmissível
TVTC: Tumor venéreo transmissível canino
U/L: Unidades por litro
VCOOG: Veterinary co-operative oncology group

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** **A:** Aspecto macroscópico de massa em região vaginal sugestiva de TVT; **B:** Fotomicrografia de exame citológico de um TVT onde observa-se figura de mitose (seta laranja) e discretos vacúolos pequenos no citoplasma (seta amarela), indicando critérios de malignidade do tumor..... 16
- Figura 2.** **A:** manipulação do Cloridrato de Doxorrubicina em da capela de fluxo laminar, utilizando equipamentos de proteção individual; **B:** equipamentos de segurança essenciais na manipulação de quimioterápicos antineoplásicos: 1) óculos de proteção; 2) gorro; 3) máscaras com filtro de carbono; 4) luvas de nitrila e 5) capa impermeável..... 16
- Figura 3.** Esquema dos momentos durante tratamento com doxorrubicina..... 17
- Figura 4.** Imagem da lesão macroscópica sequencial do TVT em uma fêmea canina durante tratamento quimioterápico com DOX, que apresentou RC do tumor após o tratamento. **A:** aspecto tumoral antes do início do tratamento; **B:** lesão 21 dias após a 1ª sessão de quimioterapia com DOX; **C:** lesão 21 dias após 2ª sessão de quimioterapia DOX; **D:** lesão 21 dias após 4ª sessão de quimioterapia com DOX..... 25
- Figura 5.** Imagem da lesão macroscópica sequencial do TVT em uma fêmea canina durante tratamento quimioterápico com DOX, que apresentou RP do tumor após o tratamento. **A:** aspecto do TVT antes do início do tratamento; **B:** lesão 21 dias após a 1ª sessão de quimioterapia; **C:** lesão 21 dias após 2ª sessão de quimioterapia; **D:** lesão 21 dias após 3ª sessão de quimioterapia e **E:** RP do tumor 21 dias após 4ª sessão com DOX..... 26
- Figura 6.** Imagem ultrassonográfica representando área heterogênea em sua maior parte hipoeecogênica de limites definidos, medindo aproximadamente 1,36 x 0,64cm, localizada cranial à região vulvar, com aparência de tecido fibrótico 21 dias após 4ª sessão com doxorrubicina..... 28
- Figura 7.** **A:** aplicação do botão anestésico com lidocaína na região do manúbrio do esterno; **B:** posicionamento para introdução da agulha (25x8); **C:** acoplamento da seringa contendo EDTA na agulha para realizar punção; **D:** obtenção do material (medula óssea)..... 45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Identificação, peso e idade das pacientes com tumor venéreo transmissível submetidas ao tratamento quimioterápico com doxorubicina.....	15
Quadro 2.	Momentos para avaliação do hemograma, bioquímico sérico, mielograma, resposta tumoral e avaliação cardíaca das pacientes submetidas ao tratamento quimioterápico com doxorubicina.....	17
Quadro 3.	Média e desvio-padrão da série vermelha e plaquetária sanguínea de cadelas portadoras de TVT, submetidas à administração de doxorubicina, Jaboticabal (SP), 2015.....	21
Quadro 4.	Média e desvio padrão dos valores absolutos da série branca do sangue de cadelas portadoras de tumor venéreo transmissível, submetidas à administração de doxorubicina, Jaboticabal (SP), 2015.....	22
Quadro 5.	Média e desvio padrão das variáveis dos mielogramas realizados nas cadelas portadoras de TVT, submetidos à administração de doxorubicina, Jaboticabal (SP), 2015.....	23
Quadro 6.	Média e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos realizados em cadelas portadoras de TVT, submetidos à administração de doxorubicina, Jaboticabal (SP), 2015.....	24
Quadro 7.	Medidas individuais dos tumores através de ultrassonografia durante diferentes momentos do tratamento de pacientes com TVT com doxorubicina, Jaboticabal (SP), 2015.....	27
Quadro 8.	Média e desvio padrão das medidas dos tumores através de ultrassonografia durante diferentes momentos do tratamento de pacientes com TVT tratados com doxorubicina, Jaboticabal (SP), 2015.....	27

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1 Introdução

Os primeiros relatos acerca do reconhecimento e tratamento do câncer foram registrados há 50 séculos por duas das mais famosas fontes escritas da medicina egípcia, conhecidos como Papiro de Ebers e Papiro de Edwin Smith (MORRISON, 2010). Já o primeiro relato do uso de Doxorubicina (DOX) em cão foi publicado na literatura veterinária em 1976 e descrevia sobre a toxicidade da doxorubicina em cães sadios (SMITH; KIRK, 1976). Após esse, outros relatos do uso deste fármaco em animais com câncer surgiram rapidamente (HENNESS et al., 1977; SCHOSTER; WYMAN, 1978; CALVERT; LEIFER, 1981).

Os efeitos adversos mais comuns associados ao uso de DOX são náusea e êmese agudas, estomatite, distúrbios gastrointestinais, alopecia, cardiotoxicidade cumulativa e até aplasia de medula óssea o que pode resultar em aumento da incidência de infecção microbiana. Neste sentido, o principal efeito colateral limitante da dose é a mielossupressão com leucopenia (principalmente granulocitopenia), trombocitopenia e anemia (MANCUSO et al., 2006; JULKA, et al., 2008), normalmente atingindo um ponto mais baixo na contagem de granulócitos (nadir) durante a segunda semana de terapia (RODASKI; DE NARDI, 2008).

O objetivo principal deste trabalho foi determinar a toxicidade de 4 aplicações com intervalos de 21 dias do cloridrato de doxorubicina na dose de 30mg/m², ou 1mg/kg para animais com peso inferior a 15kg, em cadelas portadoras de tumor venéreo transmissível (TVT), através da avaliação em diferentes momentos dos parâmetros hematológicos central e periférico, bioquímicos sanguíneos, avaliação eletro e ecocardiográfica e da resposta do tumor à quimioterapia.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Cloridrato de Doxorrubicina

A DOX é um quimioterápico classificado como um antibiótico do grupo das antraciclinas, isolado à partir de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (SUSANECK, 1983) e usado como agente antineoplásico por causa de seu amplo espectro de atividade (CAMPOS, 2011). As antraciclinas estão entre os agentes antineoplásicos mais utilizados no tratamento de uma variedade de tumores sólidos, linfomas e leucemias (RASCHI et al., 2010), podendo ser empregado em mono ou poliquimioterapias (RODASKI; DE NARDI, 2008).

As neoplasias mais frequentemente tratadas com DOX são os linfomas, sarcomas osteogênicos, carcinoma testicular, hemangiossarcoma, carcinoma de tireóide, adenocarcinoma mamário, carcinoma de células escamosas e outros tumores sólidos. Esse fármaco também é indicado para leucemia granulocítica aguda e leucemia linfocítica aguda (RODASKI; DE NARDI, 2008). Possui efetiva ação tanto em seres humanos quanto em animais (DAGLI, 2002).

1.2.1.1 Mecanismo de Ação

A DOX é um agente não específico do ciclo celular, atuando tanto nas células em fase de divisão quanto nas células em repouso. No entanto, sua principal ação citotóxica é observada durante a fase S do ciclo celular (SUSANECK, 1983; RODASKI; DE NARDI, 2008).

Os mecanismos moleculares da DOX, considerando tanto seu efeito antitumoral quanto seus efeitos tóxicos para o coração, cérebro, rim, etc. estão relacionados à alteração do DNA e produção de radicais livres (GRANADOS-PRINCIPAL, 2010). As quebras do DNA são causadas pela união do fármaco ao DNA e à enzima topoisomerase II, a qual tem um papel importante na liberação das cadeias de DNA e na condensação dos cromossomos. Com isso, ocorre uma ação mutagênica e carcinogênica (CHABNER; CALABRESI, 2001).

1.2.1.2 Farmacocinética

A farmacocinética da DOX está diretamente associada a sua ligação nas diferentes células, sendo rapidamente eliminada do sangue e distribuída nos tecidos, seguindo um modelo trifásico (RODASKI; DE NARDI, 2008). A primeira fase, que dura aproximadamente 10 minutos, representa a rápida distribuição nos tecidos principalmente do coração, rins, pulmões, fígado e baço (SUSANECK, 1983; DOROSHOW, 1996), sem ultrapassar a barreira hematoencefálica (WITHROW, 2007). A segunda fase que dura aproximadamente três horas, representa a liberação do fármaco dos órgãos de volta para o compartimento vascular (SUSANECK, 1983). Nesta fase, 75% da DOX está ligada às proteínas plasmáticas (DOROSHOW, 1996). Durante a fase final, os níveis do fármaco e seus metabólitos permanecem constantes por aproximadamente 30 horas (SUSANECK, 1983).

No cão, a meia-vida plasmática inicial é de aproximadamente 60 minutos. Nesta espécie, este fármaco é preponderantemente metabolizado no fígado, sendo excretado principalmente através da bile, fezes e urina (HAHN; RICHARDSON, 1995).

1.2.1.3 Citotoxicidade

A DOX tem uma atividade significativa contra um considerável número de tumores, incluindo alguns que são geralmente refratários a outros quimioterápicos (SUSANECK, 1983). Entretanto, o sucesso no uso clínico da DOX tem sido limitado por seus efeitos citotóxicos não seletivos, caracterizados por mielossupressão e cardiotoxicidade (SUSANECK, 1983; CHABNER; CALABRESI, 2001). Apesar de serem inúmeros os efeitos colaterais provocados pela administração da DOX, estes não devem desencorajar o uso deste fármaco na terapia do câncer. Em geral, os pacientes que recebem DOX, desde que cuidadosamente monitorados, toleram bem os efeitos adversos e são beneficiados com essa terapia (RODASKI; DE NARDI, 2008).

A toxicidade da DOX pode ser classificada em aguda, de curta duração e crônica. A toxicidade aguda inclui sinais de hipersensibilidade, como eritema cutâneo, vômitos, hipotensão, arritmias cardíacas e anafilaxia. Os efeitos de curta duração são observados nas duas primeiras semanas após a administração da DOX

e incluem transtornos gastrointestinais e hematológicos. Já a toxicidade crônica deste quimioterápico inclui perda de pelos, atrofia testicular e cardiotoxicidade (SUSANECK, 1983).

1.2.1.4 Toxicidade Hematológica

A supressão hematopoiética é uma importante complicação limitadora da dose de DOX, caracterizando-se por leucopenia e graus variáveis de anemia e trombocitopenia. A leucopenia é transitória, alcançando o nadir entre 10 a 14 dias após o tratamento, com recuperação medular 21 dias após a última sessão (SUSANECK, 1983; RODASKI; DE NARDI, 2008).

A toxicidade hematológica é a principal limitante à posologia dos fármacos citostáticos, indicando a necessidade de suspensão temporária ou permanente do fármaco.

1.2.1.5 Toxicidade Gastrointestinal

A toxicidade do trato gastrointestinal pode se apresentar de duas maneiras: uma sem gravidade, com vômitos, anorexia e diarreia de intestino delgado, e outra mais rara, porém mais grave, com colite hemorrágica, sendo necessário o tratamento hospitalar (RANGEL et al., 2009).

A gastroenterocolite associada ao uso de agentes quimioterápicos é incomum, sendo sugeridas duas hipóteses, a primeira que a gastroenterocolite hemorrágica seja induzida pela liberação de histamina após a administração do fármaco e outro mecanismo seja causado pela toxicidade resultante do efeito da DOXO sobre as células do trato gastrointestinal que encontram-se em rápida divisão (OGILVIE et al., 1991).

1.2.1.6 Hepatotoxicidade

A DOX é metabolizada principalmente pelo fígado, expondo este órgão ao efeito tóxico do fármaco. O seu principal metabólito é o 13-OH-doxorrubicinol, que possui certo grau de atividade antitumoral (BOUKET et al., 1987; CHABNER; CALABRESI, 2001).

A lesão hepática induzida pela DOX é consequência da indução de radicais livres levando a elevação significativa na produção de malondialdeído e pela depleção dos índices de glutathione observado nos tecidos do fígado de ratos. Essa lesão hepática é caracterizada por aumento significativo dos níveis séricos dos biomarcadores como alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (SAAD et al., 2001).

1.2.1.7 Cardiotoxicidade

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a fisiopatologia da cardiotoxicidade causada pelas antraciclinas, contudo, ainda não está bem estabelecido o mecanismo em que este fármaco afeta preferencialmente os cardiomiócitos. A maior hipótese envolve peroxidação lipídica e estresse oxidativo (SAWYER et al., 2010).

O mecanismo de ação da DOX suprime a síntese de DNA, RNA e proteínas (OLSON; MUSHLIN, 1990), assim como os fatores de transcrição importantes que regulam genes cardíacos específicos (ITO et al., 1990; JEYASEELAN et al., 1997). Outro mecanismo de cardiotoxicidade é a morte celular por apoptose ou necrose após exposição às antraciclinas. Devido à capacidade de regeneração cardíaca ser limitada, o número de cardiomiócitos reduz progressivamente, levando a um remodelamento ventricular (OLSON; MUSHLIN, 1990).

A cardiomiopatia induzida pela DOX, também pode ser mediada pela perda de células-tronco cardíacas e revertida por restauração da função de células progenitoras (DE ANGELIS et al., 2010). O pré-tratamento com difenidramina ou corticosteróides para reduzir a degranulação dos mastócitos pode ser útil porque a histamina tem sido implicada como mediador de cardiotoxicidade (ROSENTHAL, 2004).

Souza & Camacho (2006) verificaram semelhança da cardiomiopatia dilatada induzida pela doxorubicina com a cardiomiopatia dilatada idiopática, principalmente em relação aos achados ecocardiográficos, como dilatação de câmaras cardíacas e perda da função sistólica. Histologicamente, as lesões miocárdicas induzidas pela DOX são caracterizadas por vacuolização, miocitólise, atrofia de miócitos e fibrose (SILVA; CAMACHO, 2005).

1.2.1.8 Reações de Hipersensibilidade

Reações de hipersensibilidade tipo I são incomuns em cães que recebem DOX, e podem culminar em choque (WITHROW, 2013). Os sinais clínicos típicos aparecem durante ou imediatamente após a administração do agente, e incluem meneios encefálicos (prurido otológico), edema de face, urticária generalizada, eritema (especialmente no local de administração do fármaco), inquietação, sialorréia, êmese, diarreia e, raramente, colapso causado por hipotensão (LANA; DOBSON, 2010). Na maioria dos casos essas reações não estão relacionadas à dose administrada e são de curta duração (SUSANECK, 1983).

Recomenda-se a administração profilática de difenidramina (1mg/kg), previamente a administração da DOX, prevenindo a maioria das reações anafiláticas sistêmicas (RODASKI; DE NARDI; PIEKARZ, 2008). Além disso, a diluição da DOX em solução salina e sua administração lenta também minimizam os riscos de reações de hipersensibilidade (SUSANECK, 1983).

1.3 REFERÊNCIAS

BOUKET, R.J.; OLSON, R.D.; BRENNER, D.E.; OGUNBUNMI, E.M.; INUI, M.; FLISCHER, S. The major metabolite of doxorubicin is a potent inhibition of membrane-associated ion pumps. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.262, p.15851-15856, 1987.

CALVERT, C. A.; LEIFER, C. E. Doxorubicin for treatment of canine lymphosarcoma after development of resistance to combination chemotherapy. **Journal American Veterinary Medical Association**, Itaca, v. 179, p. 1011–1012, 1981.

CAMPOS, E.C.; O'CONNEL, J.L; MALVESTIO, L.M; ROMANO, M.M.D.; RAMOS, S.G.; CELES, M.R.N.; PRADO, C.M.; SIMÕES, M.V.; ROSSI, M.A. Calpain mediated dystrophin disruption may be a potential structural culprit behind chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 670, n. 2-3, p. 541-53. nov. 2011.

CHABNER, A.; CALABRESI, P. Chemoterapy neoplastic diseases. In: GOODMAN& GILMAN'S. **The pharmacological basis of therapeutics** 10th ed. New York: The McGraw-Hill, 2001. cap.25, p.1381-1459.

DAGLI, M. L. Z. Agentes antineoplásicos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M. M. (Ed). **Farmacologia aplicada á medicina veterinária** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.581-595, 2002.

DE ANGELIS, A.; PIEGARI, E.; CAPPETTA, D.; MARINO, L.; FILIPPELLI, A.; BERRINO, L.; FERREIRA-MARTINS, J.; ZHENG, H.; HOSODA, T.; ROTA, M.; URBANEK, K.; KAJSTURA, J.; LERI, A.; ROSSI, F.; ANVERSA, P. Anthracycline cardiomyopathy is mediated by depletion of the cardiac stem cell pool and is rescued by restoration of progenitor cell function. **Circulation**, Dallas, v. 121, p. 276-92, 2010.

DOROSHOW, J.H. Anthracyclines and anthracenediones. In: CHABNER, B.A.; LONGO, D.L. **Cancer chemotherapy and biotherapy**. 2nd ed. Philadelphia: Lippcott-Raven, 1996, chap.17. p.409-434.

GRANADOS-PRINCIPAL, S.; QUILES, J. L.; RAMIREZ-TORTOSA, C. L.; SANCHEZ-ROVIRA, P., RAMIREZ-TORTOSA, M. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, p. 1425-1438, 2010.

HAHN, K.A.; RICHARDSON, R.C. Cancer chemotherapy: **a veterinary handbook**. Malvern: Ed. Williams & Wilkins, 1995. p. 255.

HENNESS, A. M; THEILEN, G. H; PARK, R. D; BUHLES, W. C. Combination therapy for canine osteosarcoma. **Journal American Veterinary Medical Association**, Itaca, v. 170, p. 1076–1081, 1977.

ITO, H.; MILLER, S. C.; BILLINGHAM, M. E.; AKIMOTO, H.; TORTI, S. V.; WADE, R.; GAHLMANN, R.; LYONS, G.; KEDES, L.; TORTI, F. M. Doxorubicin selectively inhibits muscle gene expression in cardiac muscle cells in vivo and in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 4275 – 4279, 1990.

JEYASSELAN, R.; POIZAT, C.; WU, H. Y.; KEDES, L. Molecular mechanisms of doxorubicin-induced cardiomyopathy. Selective suppression of Reiske iron-sulfur protein, ADP/ATP translocase, and phosphofructokinase genes is associated with ATP depletion in rat cardiomyocytes. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272: p. 5828-32, 1997.

JULKA, P.; CHACKO, R.; NAG, S.; PARSHAD, R.; NAIR, A.; OH, D.; HU, Z.; et al. Aphase II study of sequential neoadjuvant gemcitabine plus doxorubicin followed by gemcitabine plus cisplatin in patients with operable breast cancer: prediction of response using molecular profiling. **British Journal of Cancer**, London, v. 98, p. 1327 – 1335, 2008.

LANA, S. E; DOBSON, J. M. Principles of chemotherapy, In DOBSON, J.M; LASCELLES, B.D.X. (Ed) **BSAVA manual of canine and feline oncology** 3rd ed. (pp. 60-79). Gloucester, British Small Animal Veterinary Association, 2010.

MANCUSO, A.; MIGLIORINO, M.; De SANTIS, S.; SAPONIERO, A.; De MARINIS, F. Correlation between anemia and functional/cognitive capacity in elderly lung cancer patients treated with chemotherapy. **Annals of Oncology**, v. 17, p.146-150, 2006.

MORRISON, W. B: Cancer chemotherapy: an annotated history, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 24, p. 1249, 2010.

OGILVIE, G.K.; OBRADOVICH, J.E; ELMSLIE, R.E.; VAIL, D.M.; MOORE, A.S.; CURTIS, C.R; STRAW, R.C.; DICKINSON, K.; COOPER, M.F.; OLSON, R. D.; MUSHLIN, P. S. Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 4, p. 3076 – 3086, 1990.

RANGEL, M. M. M.; COGLIATI, B; UBUKATA, R.; COSTA-CASAGRANDE, T. A.; ALVES, A.; OLIVEIRA, K. D.; DAGLI, M, A, Z. Aspectos gerais sobre os principais antineoplásicos utilizados na clínica veterinária de cães e gatos - revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 14, n. 81, p. 38-52, 2009.

RASCHI, E.; VASINA, V.; URSINO, M. G.; BORIANI, G.; MARTONI, A.; DE PONTI, F. Anticancer drugs and cardiotoxicity: insights and perspectives in the era of targeted therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 125, p. 196 – 218, 2010.

RODASKI, S.; DE NARDI, A.B; **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. São Paulo: MedVet, 2008. p. 115.

RODASKI, S.; DE NARDI, A.B.; PIEKARZ, C.H. Quimioterapia antineoplásica. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2008. cap. 9, p. 161-178.

ROSENTHAL, R.C. **Segredos em oncologia veterinária**. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 24; p. 183-186.

SAAD, S.Y.; NAJJAR, T.A.; AMMAR, C.; AL-RIKABI, A.L. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. **Pharmacological Research**, London, v.43, p.211 – 218, 2001.

SAWYER, D. B.; PENG, X.; CHEN, B.; PENTASSUGLIA, L.; LIM, C. C. Mechanisms of anthracycline cardiac injury: can we identify strategies for cardioprotection? **Progress in Cardiovascular Diseases**, Philadelphia, v. 53, p. 105-113, 2010.

SCHOSTER, J. V; WYMAN, M. Remission of orbital sarcoma in a dog using doxorubicin therapy. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 172, p. 1101–1103, 1978.

SILVA, C.E.V.; CAMACHO, A.A. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, p. 300-306, 2005.

SMITH, D.M; KIRK, G.R. Some systemic effects of adriamycin on the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Sakeword, v. 12: 92–97, 1976.

SOUZA, R.C.A.; CAMACHO, A.A. Neurohormonal, hemodynamic, and electrocardiographic evaluations of healthy dogs receiving long-term administration of doxorubicin. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 67, n. 8, p.1319-1325, 2006.

SUSANECK, S.J.; Doxorubicin therapy in the dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v.182, n.1, p.70-72, 1983.

WITHROW, S.J. **Small animal clinical oncology**. Philadelphia: Ed. W.B. Saunders, 2007. p. 844.

WITHROW, S.J.; **Small animal clinical oncology**. Philadelphia: Ed. W.B. Saunders, 2013. p. 844.

VETERINARY COOPERATIVE ONCOLOGY GROUP. Common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats, **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v. 1, p.1, 2011.

CAPÍTULO 2 – Toxicidade do cloridrato de doxorubicina na dose cumulativa de 120mg/m², em cadelas com tumor venéreo transmissível

RESUMO - O Cloridrato de Doxorubicina (DOX) é considerado um dos agentes mais ativos disponíveis para o tratamento quimioterápico do câncer, além de ser um dos antineoplásicos mais utilizados para o tratamento de tumor venéreo transmissível canino resistente à vincristina. Com intuito de melhor conhecimento dos efeitos adversos promovidos pelo uso da DOX em cães, foi delineado um estudo composto por um grupo de 10 cães domésticos, do sexo feminino, sem raça definida, com peso entre 4,5 e 24 kg e idade média de 5 anos, portadores de TVT de ocorrência natural, confirmados por avaliação citológica, sem metástases clinicamente detectáveis ou quimioterapia prévia, que receberam o Cloridrato de Doxorubicina na dose de 30 mg/m² ou 1mg/kg para os animais com peso inferior a 15kg. Foram avaliados os efeitos da DOX sob o sangue periférico e medula óssea, além de avaliação da bioquímica sanguínea e resposta de citotoxicidade tumoral. A determinação da toxicidade gerada pelo tratamento quimioterápico com DOX baseou-se nos critérios de efeitos adversos estabelecidos pelo consenso da cooperativa de oncologia veterinária (VCOOG). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo método de variância com medidas repetidas; regressão linear, quadrática e cúbica e quando houve diferença significativa entre médias ($P < 0,05$), estas foram comparadas entre si pelo teste de Tukey. Os valores da série vermelha do sangue não apresentaram alterações significativas entre os momentos; a contagem de leucócitos totais foi significativamente maior no momento inicial (M0) quando comparada com o 14º dia após a quarta sessão (M7); os neutrófilos segmentados apresentaram redução significativa no 14º dia após a primeira e após a terceira sessão quimioterápica quando comparados com o momento inicial; os valores de linfócitos, basófilos, eosinófilos e neutrófilos bastonetes não diferiram entre os momentos avaliados. No mielograma, as contagens de rubríцитos, metarubríцитos apresentaram aumento significativo 21 dias após o término do tratamento quimioterápico (M8); a relação mieloide:eritroide apresentou diminuição significativa ao final do tratamento (M8); os neutrófilos bastonetes e neutrófilos segmentados, demonstraram redução dos valores no M8. Os parâmetros bioquímicos (ALT, AST, FA, albumina, creatinina, ureia e proteína total), mesmo variação dos valores estatisticamente significativos entre os momentos, permaneceram dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie canina. A mensuração tumoral em cm² realizada através de ultrassonografia confirmou que o tumor foi significativamente maior no M0 diferenciando-se dos demais momentos (M2 – M8) em virtude de uma alta resposta de citotoxicidade tumoral logo após a primeira sessão quimioterápica com DOX. Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram que o uso de DOX na dose cumulativa de 120mg/m² no tratamento de cães portadores de TVT foi eficaz para a cura do tumor na maioria dos pacientes, e o grau de toxicidade do fármaco não promoveu alterações clínicas graves.

Palavras-chave: Quimioterapia antineoplásica, oncologia, câncer, antraciclinas, efeitos adversos.

Cumulative toxicity of doxorubicin hydrochloride on cumulative dose of 120mg/m², in dogs with transmissible venereal tumor

ABSTRACT - Doxorubicin (DOX) is considered one of the most active agent available for chemotherapy treatment of cancer, in addition to be one of the most antineoplastic drug used for the treatment of canine Transmissible Venereal Tumor resistant to vincristine. For a better understanding of the side effects caused by the use of DOX in dogs, we did an study composed by 10 domestic, female, mixed breed dogs with Transmissible Venereal Tumor of natural occurrence, diagnosed by cytology, with no evidence of metastasis and without previous chemotherapy treatment, that received DOX in dose of 30 mg/m² ou 1 mg/kg for animals weighing less than 15 kg. Were evaluated the effects of DOX in the peripheral blood and bone marrow, blood biochemistry and tumor cytotoxicity response. In order to standardize the toxicity level, we applied the terminology based on the addapted tables of the veterinary co-operative oncology group-Common terminology criteria for adverse events – VCOG-CTCAE). Statistical data were analyzed by the variance method with repeated measures; linear regression, quadratic and cubic and when there was a significant difference between means ($P < 0.05$), these were compared by Tukey test. The values of red blood series did not change significantly between moments; the white blood cell count was significantly higher at baseline (M0) when compared to the 14th day after the fourth session (M7); segmented neutrophils had significant reduction on the 14th day after the first and third chemotherapy session when compared with the initial moment; lymphocytes, basophils, eosinophils and neutrophils rods did not differ between the moments. In The myelogram, rubricitos, metarubricitos ratio, showed a significant increase 21 days after the end of chemotherapy (M8), and myeloid: erythroid relationship showed significantly decreased after the treatment (M8); neutrophils rods and segmented neutrophils showed reduced values in M8. Biochemical parameters (ALT, AST, AP, albumin, creatinine, urea and total protein), even with a statistically significant variation in values between moments, remained within normal parameters for dogs. The tumor size were measured in cm² by ultrasound and confirm that was significantly higher in M0, differing from the other moments (M2 – M8) because of a high response tumor cytotoxicity after the first chemotherapy session with DOX. The results of this study showed that the use of DOX in cumulative dose of 120mg/m² in the treatment of dogs with TVT was effective in tumor cure in most patients, and the degree of toxicity of the drug did not cause clinically significant changes.

Key-words: Antineoplastic chemotherapy, oncology, cancer, anthracyclines, side effects.

2.1 INTRODUÇÃO

O Tumor venéreo transmissível canino (TVTC) é uma neoplasia de ocorrência natural, transmissível entre os cães a partir da transferência de células neoplásicas, principalmente através do coito. A doença manifesta-se com aparecimento de tumores principalmente localizados na genitália de machos ou fêmeas (POWELL, 1902; KARLSON; MANN, 1952; COHEN, 1985; STRAKOVA; MURCHISON, 2014). Possui maior incidência principalmente em cães que exibem vida sexual sem restrições (DAS; DAS, 2000). O TVT é a neoplasia que possui a linhagem de células mais antiga e amplamente disseminada entre os mamíferos (MURCHISON et al., 2014).

Dentre as modalidades terapêuticas citadas para o TVTC, estão a cirurgia, radioterapia, imunoterapia e a quimioterapia antineoplásica, sendo esta última opção a mais utilizada (TINUCCI-COSTA, 2008).

O sulfato de vincristina é o fármaco de primeira escolha para o tratamento de TVT, demonstrando eficácia em mais de 80% dos casos. Entretanto, existem alguns tumores que são refratários a esse tratamento, fazendo-se necessário a substituição deste fármaco (SAID et al., 2009).

A doxorrubicina (DOX) é o agente citotóxico mais ativo, disponível para uma grande variedade de neoplasias em animais de companhia. Esse quimioterápico pode ser usado isoladamente ou em combinação com outros fármacos para o tratamento de linfomas, osteossarcomas, neoplasias de origem mesenquimal ou epitelial (WHITROW, 2013) e para TVT resistente à vincristina (SOUSA et al., 2000; GERARDI, 2008). A maioria dos protocolos estabelecem a dose cumulativa de DOX em 120 a 150 mg/m² (quatro a cinco sessões), a fim de limitar a toxicidade potencial na população em geral (WHITROW, 2013).

Neste estudo, foram avaliados os efeitos da DOX em sangue periférico e medula óssea, além de avaliação da bioquímica sérica, cardiotoxicidade e citotoxicidade tumoral de 4 aplicações a cada 21 dias na dose de 30mg/m², ou 1mg/kg para animais com peso inferior a 15kg, em cadelas portadoras de TVT, através da avaliação em diferentes momentos. Visando padronizar os graus de

toxicidade, os critérios utilizados serão baseados nas tabelas do consenso sobre terminologia para eventos adversos após a quimioterapia antineoplásica em cães e gatos (VCOG-CTCAE, 2011), conforme o apêndice D. Desta forma, obteremos um melhor conhecimento da realidade clínica dos efeitos adversos em cães submetidos à quimioterapia com doxorubicina, verificando possíveis relações com as variáveis propostas. Além disso, em termos clínicos, poderá ser facilitada a prevenção destes efeitos e fornecida aos proprietários informações mais detalhadas em relação ao tratamento quimioterápico.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal, sob o protocolo nº 015013/14.

2.2.1 Instalações

Os procedimentos deste estudo foram realizados no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP) “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal – SP.

Durante todo o período de tratamento, os pacientes foram alojados no canil da instituição, recebendo água e ração Granplus (Guabi®) *ad libitum*, com monitoramento constantemente pela equipe do projeto.

2.2.2 Protocolo Experimental

O projeto foi composto por 10 cães domésticos (*Canis familiaris*), fêmeas, sem raça definida, com peso entre 4,5 e 24 kg e idade média de cinco anos (Quadro 1), portadores de TVT de ocorrência natural (Figura 1-A), confirmados por avaliação citológica conforme observado na Figura 1-B, sem metástases clinicamente detectáveis ou quimioterapia prévia. O tutor de cada cão foi devidamente informado sobre o projeto de pesquisa, conforme o termo de consentimento livre e esclarecido anexo (Apêndice A), autorizando sua inclusão formalmente.

Quadro 1: Identificação, peso e idade das pacientes com tumor venéreo transmissível submetidas ao tratamento quimioterápico com doxorubicina.

Identificação das Pacientes	Peso (Kg)	Idade
A1	10,0	7 anos
A2	16,0	3 anos
A3	22,3	2 anos
A4	4,5	3 anos
A5	11,4	5 anos
A6	7,0	8 anos
A7	24,0	9 anos
A8	6,9	4 anos
A9	16,5	3 anos
A10	8,4	4 anos

Todos os frascos de DOXO comercial (Cloridrato de doxorubicina, Apresentação Eurofarma, Brasil), foram do mesmo lote com intuito de melhor padronização do fármaco. A diluição foi feita em cloreto de sódio a 0,9% estéril. Toda manipulação foi realizada em capela de fluxo laminar vertical classe II, tipo B2, seguindo as normas de proteção para manipulação de fármacos quimioterápicos, conforme ilustrado na Figura 2.

A administração da DOXO foi realizada por infusão contínua na veia cefálica durante 30 minutos, com intervalo de 21 dias entre cada administração, totalizando 4 sessões. A dose cumulativa de 120mg/m² foi proposta a fim de limitar o potencial tóxico da DOXO e ao mesmo tempo ser eficaz para o TVT. Previamente à administração da DOX os pacientes receberam cloridrato de difenidramina na dose de 1mg/kg pela via intramuscular, visando evitar reações de hipersensibilidade.

As avaliações hematológicas, central e periférica, bioquímica sérica, eletro e ecocardiográficas foram realizadas de acordo com os momentos descritos no Quadro 2 e esquematizado na Figura 3.

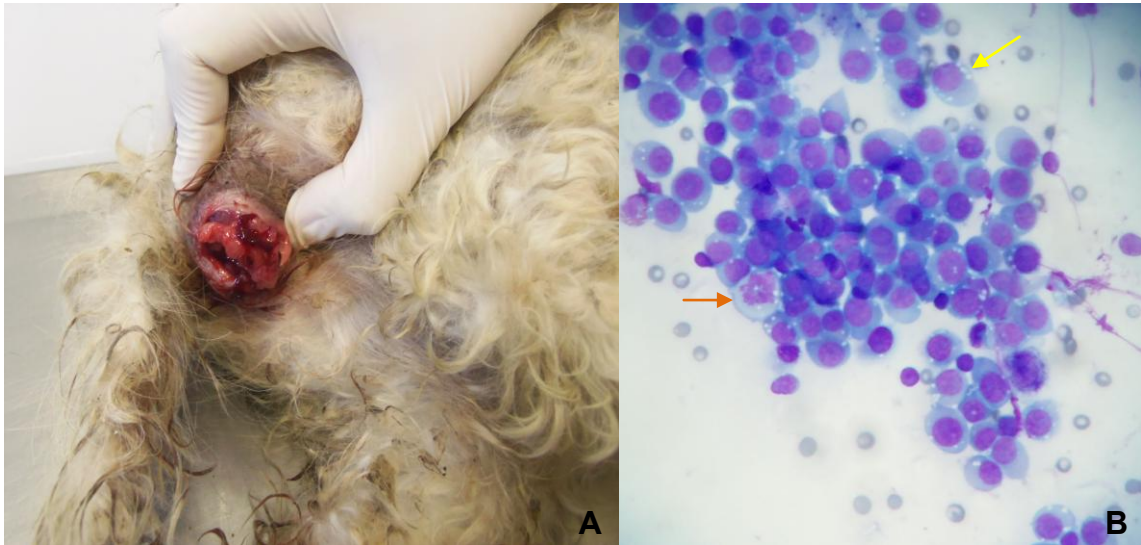


Figura 1: **A:** Aspecto macroscópico de massa em região vaginal sugestiva de TVT; **B:** Fotomicrografia de exame citológico de um TVT onde observa-se figura de mitose (seta laranja) e discretos vacúolos pequenos no citoplasma (seta amarela), indicando critérios de malignidade do tumor.

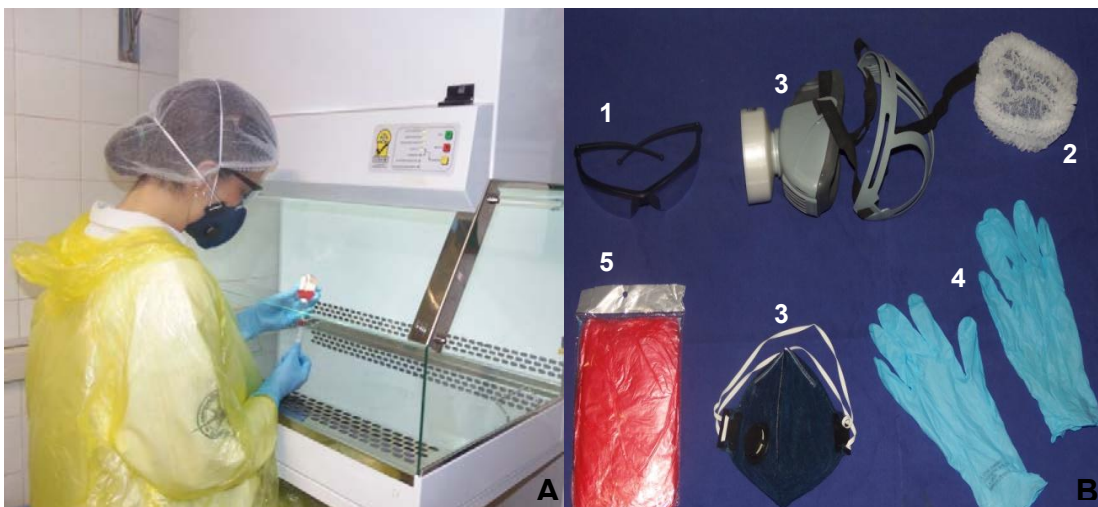


Figura 2: **A:** manipulação do Cloridrato de Doxorrubicina em da capela de fluxo laminar, utilizando equipamentos de proteção individual; **B:** equipamentos de segurança essenciais na manipulação de quimioterápicos antineoplásicos: 1) óculos de proteção; 2) gorro; 3) máscaras com filtro de carbono; 4) luvas de nitrila e 5) capa impermeável.

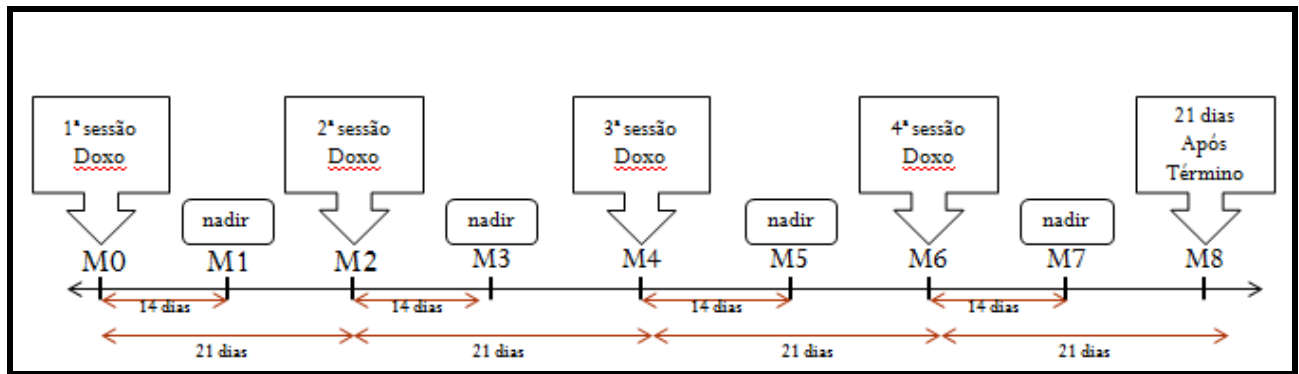


Figura 3. Esquema dos momentos durante tratamento com doxorubicina.

Quadro 2: Momentos para avaliação do hemograma, bioquímico sérico, mielograma, resposta tumoral e avaliação cardíaca das pacientes submetidas ao tratamento quimioterápico com doxorubicina.

Exames Realizados	Momentos								
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Hemograma	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Bioquímico	X		X		X		X		X
Mielograma	X				X				X
Citotoxicidade Tumoral	X		X		X		X		X
Avaliação Cardíaca	X		X		X		X		X

M0: Imediatamente antes do início do tratamento quimioterápico com doxorubicina; **M1:** 14 dias após 1ª sessão com doxorubicina; **M2:** 21 dias após 1ª sessão com doxorubicina; **M3:** 14 dias após a 2ª sessão com doxorubicina; **M4:** 21 dias após 2ª sessão com doxorubicina; **M5:** 14 dias após 3ª sessão com doxorubicina; **M6:** 21 dias após 3ª sessão com doxorubicina; **M7:** 14 dias após 4ª sessão com doxorubicina; **M8:** 21 dias após 4ª sessão com doxorubicina.

2.2.3 Avaliação Hematológica Periférica

As amostras de sangue foram colhidas por meio de punção venosa jugular externa, envasadas em tubos devidamente identificados contendo em seu interior o

anticoagulante ácido etileno diaminotetracético dissódico a 10% (Na₂EDTA) na proporção de 1mg/mL de sangue e processados imediatamente.

Os hemogramas foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da FCAV – Unesp – Jaboticabal/SP. As contagens globais de eritrócitos, o volume corpuscular médio, o hematócrito, a hemoglobina, contagens globais de leucócitos e plaquetas foram realizados por método automático em aparelho modelo ABX Micros ESV 60 – Horiba medical. As contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas em esfregaços sanguíneos corados com corantes a base de Romanowsky e analisados por microscopia óptica de luz. Os valores foram baseados nos parâmetros de Weiss; Wardrop, (2010).

2.2.4 Avaliação Hematológica Central

No presente trabalho foram analisadas 30 amostras de medula óssea correspondentes a três diferentes momentos M0, M4 e M8. As amostras foram obtidas por punção biópsia aspirativa de medula óssea esternal, coletadas no Hospital Veterinário da Unesp – Jaboticabal e avaliadas pela Profa. Dra. Marcia Ferreira da Rosa Sobreira.

Antes do procedimento, os pacientes foram submetidos a analgesia e sedação com clorpromazina (0,5mg/kg) e meperidina (3 mg/kg), pela via intramuscular, seguidas de tricotomia e antissepsia na região esternal e aplicação de botão anestésico local com cloridrato de lidocaína 2% sem vasoconstrictor. A aspiração do material foi por meio de agulha (40x12 ou 25x8), conforme metodologia ilustrada no Apêndice B. As lâminas foram preparadas utilizando a técnica de esfregaço e coradas pela solução a base de Romanowsky. Todas as amostras foram analisadas em microscopia óptica (objetiva de 100x) com contagem de 500 células por lâmina.

2.2.5 Avaliação Bioquímica Sérica

Para avaliação da bioquímica sérica, o sangue colhido da veia jugular foi acondicionado em tubos devidamente identificados, sem a presença do anticoagulante. Estes foram mantidos em temperatura ambiente até a formação e

retração do coágulo, e então centrifugados para a separação das alíquotas de soro, para posterior realização dos exames bioquímicos.

Para avaliação hepática, foram determinadas as atividades das enzimas Fosfatase Alcalina (FA) (método cinético UV-IFCC), Alanina Aminotransferase (ALT) (método Bowers e Mc Comb modificado), além da concentração de proteína total (método do biureto) e albumina (método do verde de bromocresol). A avaliação renal incluiu a dosagem de ureia (Metodologia enzimático UV) e creatinina sérica, (método reação de jaffé modificado).

Todos os exames bioquímicos foram realizados utilizando kits comerciais LABTEST® - Lagoa Santa, MG, conforme as instruções fornecidas pelo fabricante, e as leituras das reações foram realizadas pelo equipamento de espectofotometria semi-automático (LABQUEST® - Belo Horizonte, MG), com luz de comprimento de onda apropriado para cada teste.

2.2.6 Avaliação dos Efeitos Adversos

A avaliação dos efeitos adversos manifestados por cadelas portadoras de TVT, após administração de doxorubicina incluirá a classificação segundo o VCOG-CTCAE. Esta descrição exhibe graus que variam de 1 a 5, indicando a proporção da gravidade dos efeitos indesejáveis causados pela quimioterapia.

Serão detalhados todos os efeitos observados secundariamente a cada sessão quimioterápica, como a avaliação da hematotoxicidade, mielotoxicidade, alterações bioquímicas séricas e efeitos cardiovasculares, bem como a sua classificação em graus. Serão descritos também, os efeitos adversos inespecíficos, assim como medidas de controle destas ocorrências e os momentos em que ocorreram.

2.2.7 Avaliação da Resposta Tumoral

A resposta à quimioterapia foi realizada através de avaliação macroscópica do tumor e mensuração por ultrassonografia, adquirindo medidas da largura e comprimento da massa, para a obtenção da área em cm². As avaliações foram realizadas antes de cada sessão quimioterápica.

Foi considerando como remissão completa (RC) do tumor quando houve desaparecimento total da lesão e dos sinais clínicos da doença, remissão parcial (RP) quando houve redução do volume tumoral maior ou igual a 50% ou ainda, diminuição do diâmetro máximo do tumor de no mínimo 30%, doença estável (DE) quando não houve aumento ou diminuição do tamanho do tumor ou sinais clínicos e doença progressiva (DP) quando houve aumento do volume do tumor ou aparecimento de novas lesões. Ao término do tratamento, realizou-se exame citológico, através de swab vaginal para confirmação da remissão completa do tumor.

2.2.8 Análise Estatística

As variáveis estudadas foram determinadas por análise de variância com medidas repetidas no tempo, em que o fator testado foi momento (até 09 níveis), com os animais constituindo os blocos (n=10). Quando houve diferença significativa entre médias ($P < 0,05$), estas foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Neste caso, as variáveis também foram analisadas por regressão (linear, quadrática e cúbica) das mesmas sobre os momentos. Para tanto, foi utilizado o procedimento General Linear Models (GLM) do programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary. NC, USA).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Avaliação Hematológica Periférica

2.3.1.1 Série Vermelha e Plaquetograma

As variáveis da série vermelha sanguínea (contagem global de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM e CHCM), ao longo e após o término do tratamento (M1-M8), não foram significativas quando comparadas com o valor basal (M0) ($p > 0,05$). Os valores da série vermelha e plaquetograma apresentaram-se dentro dos parâmetros de referência para a espécie canina, durante todo o tratamento com o Cloridrato de Doxorrubicina, conforme disposto no Quadro 3.

Quadro 3. Média e desvio-padrão da série vermelha e plaquetária sanguínea de cadelas portadoras de TVT, submetidas à administração de doxorrubicina, Jaboticabal (SP), 2015.

Variáveis da Série Vermelha e Plaquetária Sanguínea	Momentos								
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6.524 $\pm$ 1.172 ^A	6.438 $\pm$ 1.765 ^A	6.589 $\pm$ 1.253 ^A	6.740 $\pm$ 1.053 ^A	6.325 $\pm$ 1.370 ^A	6.810 $\pm$ 0.905 ^A	7.190 $\pm$ 0.914 ^A	6.750 $\pm$ 0.863 ^A	6.610 $\pm$ 0.658 ^A
Hemoglobina (g/dL)	14.49 $\pm$ 2.11 ^A	14.20 $\pm$ 2.79 ^A	14.60 $\pm$ 2.02 ^A	14.59 $\pm$ 1.85 ^A	13.96 $\pm$ 1.93 ^A	15.10 $\pm$ 2.08 ^A	14.50 $\pm$ 1.97 ^A	14.90 $\pm$ 2.14 ^A	15.10 $\pm$ 1.87 ^A
Hematócrito (%)	42.04 $\pm$ 6.64 ^A	41.43 $\pm$ 10.35 ^A	42.46 $\pm$ 7.34 ^A	43.60 $\pm$ 5.69 ^A	40.28 $\pm$ 7.85 ^A	45.85 $\pm$ 6.49 ^A	46.10 $\pm$ 7.08 ^A	44.10 $\pm$ 6.02 ^A	41.30 $\pm$ 4.33 ^A
VCM	64 $\pm$ 4.5 ^A	65 $\pm$ 4.1 ^A	64 $\pm$ 3.6 ^A	65 $\pm$ 3.2 ^A	64 $\pm$ 2.3 ^A	65 $\pm$ 3.7 ^A	64 $\pm$ 4.2 ^A	65 $\pm$ 2.7 ^A	65 $\pm$ 2.1 ^A
CHCM	35 $\pm$ 1.9 ^A	35 $\pm$ 3.7 ^A	34 $\pm$ 1.0 ^A	34 $\pm$ 2.2 ^A	35 $\pm$ 4.2 ^A	33 $\pm$ 1.5 ^A	35 $\pm$ 4.0 ^A	35 $\pm$ 3.5 ^A	35 $\pm$ 1.9 ^A
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	267.8 $\pm$ 92.4 ^A	271.0 $\pm$ 90.8 ^A	249.7 $\pm$ 67.1 ^A	261.0 $\pm$ 74.3 ^A	224.8 $\pm$ 74.4 ^A	267.5 $\pm$ 59.1 ^A	275.0 $\pm$ 76.9 ^A	234.0 $\pm$ 72.2 ^A	307.0 $\pm$ 72.8 ^A

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem os momentos entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

2.3.1.2 Série Branca

Em relação aos leucócitos totais, observa-se diferença significativa ($p=0,04$) quando comparando o M7 com o momento basal (M0). Na variável neutrófilo segmentado, houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,01$) entre os momentos M1 e M5 em relação ao valor do M0. O parâmetro linfócito foi significativo na análise de variância ($p=0,03$), entretanto não houve diferença significativa entre os momentos pelo teste de Tukey. As variáveis basófilo, eosinófilo e neutrófilo bastonete não diferiram entre os momentos avaliados ($p>0,05$). As médias e desvios-padrão dos valores do leucograma estão expostos no Quadro 4.

Quadro 4. Média e desvio padrão dos valores absolutos da série branca do sangue de cadelas portadoras de tumor venéreo transmissível, submetidas à administração de doxorubicina, Jaboticabal (SP), 2015.

Parâmetros Leucocitários (x10 ³ /μL)	Momentos								
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Leucócitos totais	11.3 ± 6.8 ^A	8.2 ± 3.9 ^{AB}	9.5 ± 7.7 ^{AB}	7.4 ± 3.2 ^{AB}	6.6 ± 3.8 ^{AB}	8.0 ± 3.4 ^{AB}	8.0 ± 3.7 ^{AB}	6.3 ± 2.2 ^B	7.2 ± 2.5 ^{AB}
Basófilos	0 ± 0 ^A	15.0 ± 47.4 ^A	31.0 ± 98.0 ^A	14.0 ± 44.2 ^A	9.0 ± 28.4 ^A	47.0 ± 80.2 ^A	10.0 ± 30.0 ^A	10.0 ± 30.0 ^A	8.8 ± 26.6 ^A
Eosinófilo	620.0 ± 615.7 ^A	766.0 ± 1079.8 ^A	719.0 ± 727.3 ^A	450.0 ± 350.8 ^A	460.0 ± 501.5 ^A	1345.0 ± 2238.5 ^A	484.4 ± 285.3 ^A	395.5 ± 269.2 ^A	802.2 ± 474.6 ^A
Neutrófilo Bastonete	0 ± 0 ^A	62.0 ± 196.0 ^A	14.0 ± 29.8 ^A	6.0 ± 18.9 ^A	0 ± 0 ^A	25.0 ± 56.8 ^A	13.3 ± 28.2 ^A	7.7 ± 15.6 ^A	405.5 ± 1216.6 ^A
Neutrófilo segmentado	9243.0 ± 5788.4 ^A	5543.0 ± 2469.6 ^{AB}	7399.0 ± 6598.7 ^{AB}	5175.0 ± 2103.5 ^{AB}	4880.0 ± 3386.5 ^{AB}	5475.0 ± 2241.8 ^{AB}	5935.5 ± 3173.4 ^{AB}	4665.5 ± 1599.4 ^B	5131.1 ± 2309.8 ^{AB}
Linfócitos	1318.0 ± 1418.9 ^A	1375.0 ± 947.1 ^A	1050.0 ± 829.7 ^A	1414.0 ± 1147.4 ^A	797.0 ± 557.1 ^A	1556.0 ± 1783.6 ^A	1374.4 ± 991.8 ^A	1081.1 ± 1163.1 ^A	701.1 ± 369.7 ^A
Monócitos	476.0 ± 398.2 ^A	436.0 ± 391.1 ^A	330.0 ± 254.9 ^A	350.0 ± 315.0 ^A	269.0 ± 196.3 ^A	290.0 ± 229.7 ^A	182.2 ± 103.2 ^A	141.1 ± 157.4 ^A	156.6 ± 112.8 ^A

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem os momentos entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

2.3.2 Avaliação Hematológica Central

Entre valores obtidos no mielograma, a contagem de rubríцитos apresentou diferença significativa (p=0,02), demonstrando aumento de M4 para M8. Os metarrubríцитos apresentaram aumento crescente dos valores, sendo o momento M8 significativamente maior (p<0,001) quando comparado com os valores do M0 e M4. As variáveis neutrófilo bastonete e neutrófilo segmentado demonstraram diferença significativa no momento M8 (p=0,006 e p<0,001 respectivamente), apresentando menor contagem de células quando comparado com os momentos 0 e 4. Os valores da relação mieloide:eritroide apresentaram diferença significativa (p=0,001) no M8 quando comparado com M0 e M4, devido a um aumento expressivo na proporção dessas células (Quadro 5).

Quadro 5: Média e desvio padrão das variáveis dos mielogramas realizados nas cadelas portadoras de TVT, submetidos à administração de doxorubicina, Jaboticabal (SP), 2015.

Variáveis da Medula óssea	Momentos		
	M0	M4	M8
Rubriblasto	0.8 ± 0.2^A	1.0 ± 0.2^A	0.8 ± 0.5^A
Prorubricito	2.3 ± 0.3^A	2.2 ± 0.7^A	2.2 ± 0.8^A
Rubricito	31.4 ± 2.3^{AB}	30.8 ± 6.1^A	38.7 ± 6.9^B
Metarrubricito	14.8 ± 2.3^A	17.4 ± 3.8^A	26.2 ± 6.9^B
Mieloblastos	0.6 ± 0.2^A	0.6 ± 0.2^A	0.7 ± 0.3^A
Promielócitos	1.5 ± 0.5^A	1.4 ± 0.4^A	1.3 ± 0.5^A
Neutrófilos Mielócitos	3.3 ± 0.6^A	3.2 ± 1.4^A	1.9 ± 1.2^A
Neutrófilos Metamielócitos	6.2 ± 1.4^A	6.1 ± 1.1^A	5.4 ± 4.0^A
Neutrófilos Bastonetes	11.7 ± 1.3^A	11.9 ± 2.4^A	7.2 ± 3.1^B
Neutrófilos Segmentados	19.6 ± 1.6^A	17.8 ± 4.3^A	9.1 ± 2.8^B
Mielócito/Metamielócito/Eosinófilo	1.2 ± 0.2^A	1.1 ± 0.7^A	1.0 ± 0.7^A
Granulócitos Eosinófilos	1.5 ± 0.5^A	1.5 ± 1.5^A	0.9 ± 0.8^A
Linfócitos	3.2 ± 0.8^A	3.1 ± 0.7^A	2.6 ± 0.8^A
Plasmócitos	0.7 ± 0.3^A	0.8 ± 0.8^A	0.8 ± 0.6^A
Monócitos	0.4 ± 0.2^A	0.3 ± 0.2^A	0.4 ± 0.3^A
Megacariócitos	210 ± 70^A	204 ± 70^A	206 ± 56^A
Relação Mielóide: Eritróide	0.88 ± 0.11^A	0.84 ± 0.28^A	0.40 ± 0.17^B

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem os momentos entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

2.3.3 Avaliação Bioquímica Sérica

As variáveis creatinina e ALT apresentaram diferença significativa no momento M2 (Quadro 6), demonstrando valor superior quando comparadas ao momento basal (M0), entretanto, estes valores ainda se mantiveram dentro da normalidade quando comparados com os valores de referência para a espécie canina. Os valores de AST foram estatisticamente significativos ($p=0,001$), sendo que o M2 diferiu dos momentos M6 e M8, devido ao decréscimo dos valores. Apesar da diferença estatística, este resultado não tem significado clínico, pois todos os valores desta enzima se encontram dentro dos parâmetros de referência para a espécie canina. A variável albumina apresentou diferença significativa ($p=0,001$) onde M6 diferiu de M0, M2 e M4 e o M8 foi diferente estatisticamente do momento basal.

Quadro 6: Média e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos realizados em cadelas portadoras de TVT, submetidos à administração de doxorrubicina, Jaboticabal (SP), 2015.

Variáveis dos Parâmetros Bioquímicos	Momentos				
	M0	M2	M4	M6	M8
Creatinina	0.8 ± 0.1 ^A	0.9 ± 0.1 ^{AB}	1.0 ± 0.1 ^B	1.0 ± 0.0 ^{AB}	0.9 ± 0.1 ^{AB}
Uréia	30.5 ± 9.9 ^A	32.8 ± 7.4 ^A	34.1 ± 6.9 ^A	35.3 ± 14.0 ^A	31.2 ± 8.0 ^A
Alanina Aminotransferase	24.4 ± 12.8 ^A	34.0 ± 15.3 ^{AB}	58.1 ± 37.4 ^B	41.2 ± 16.1 ^{AB}	50.1 ± 29.3 ^{AB}
Aspartato Aminotransferase	27.8 ± 11.4 ^{AB}	25.1 ± 8.3 ^{AB}	36.7 ± 15.6 ^A	22.7 ± 11.4 ^B	23.2 ± 7.6 ^B
Fosfatase Alcalina	58.4 ± 24.0 ^A	55.2 ± 19.8 ^A	52.3 ± 19.7 ^A	52.6 ± 12.7 ^A	50.5 ± 15.8 ^A
Proteína Total	6.9 ± 1.4 ^A	7.8 ± 1.3 ^A	7.5 ± 1.9 ^A	7.7 ± 0.9 ^A	7.3 ± 0.5 ^A
Albumina	2.3 ± 0.4 ^A	2.8 ± 0.6 ^{AB}	2.8 ± 0.4 ^{AB}	3.4 ± 0.5 ^C	3.0 ± 0.3 ^{BC}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem os momentos entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

2.3.4 Citotoxicidade Tumoral

A mensuração realizada através de ultrassonografia revelou diferença expressiva em relação aos momentos ($p<0,001$) durante o tratamento quimioterápico. Através das medidas em cm^2 , observou-se redução contínua do tamanho tumoral, tanto nos valores individuais de cada paciente (Quadro 7) quanto nos valores das médias e desvio-padrão (Quadro 8), onde M0 diferenciou-se dos demais momentos (M2, M4, M6 e M8) em virtude de uma alta resposta de citotoxicidade tumoral logo após a primeira sessão quimioterápica com DOX. Entre os dez pacientes submetidos ao tratamento, nove apresentaram RC (Figura 3) e apenas um obteve RP (Figura 4).

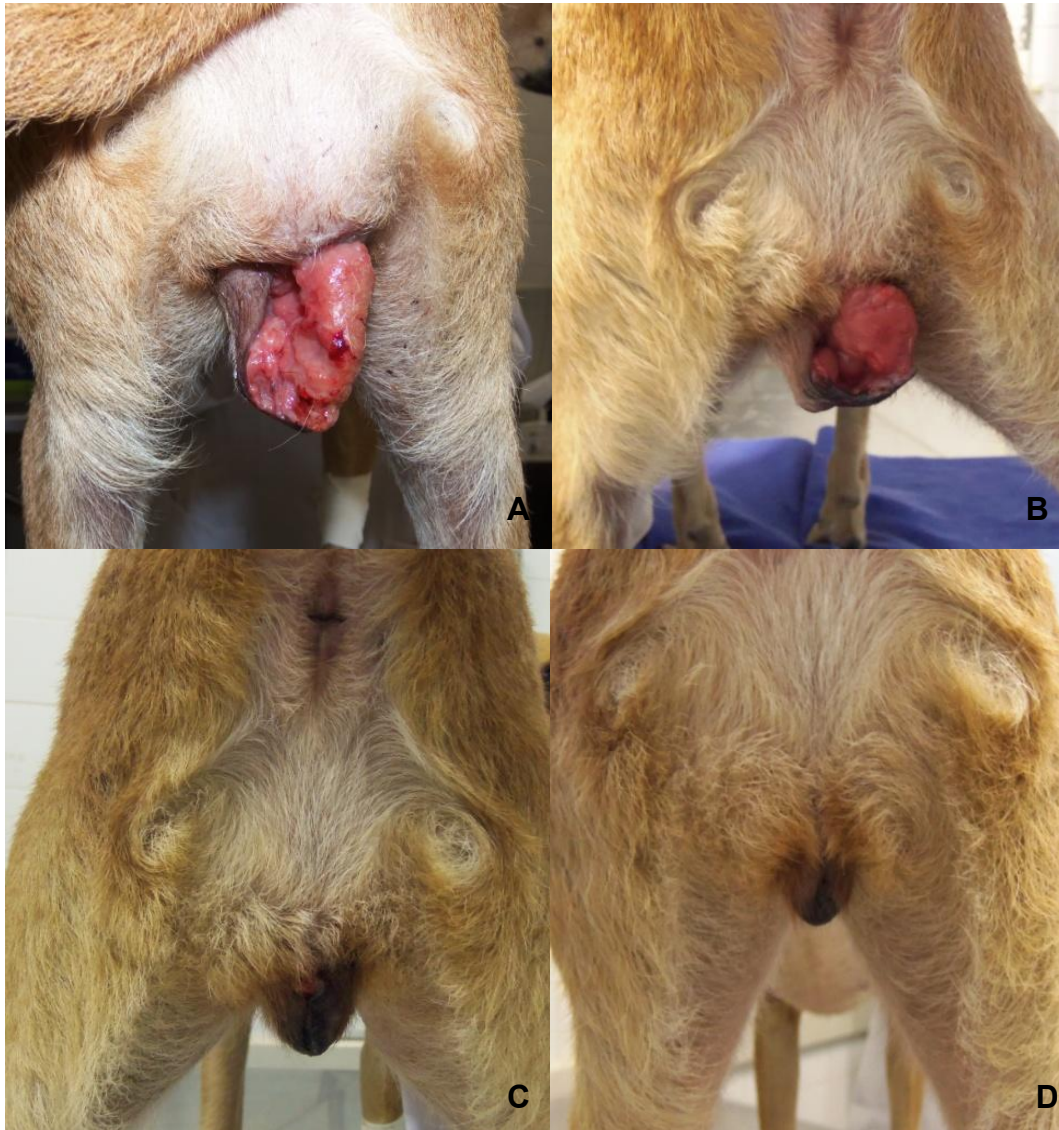


Figura 4: Imagem da lesão macroscópica sequencial do TVT em uma fêmea canina durante tratamento quimioterápico com DOX, que apresentou RC do tumor após o tratamento. **A:** aspecto tumoral antes do início do tratamento; **B:** lesão 21 dias após a 1ª sessão de quimioterapia com DOX; **C:** lesão 21 dias após 2ª sessão de quimioterapia DOX; **D:** lesão 21 dias após 4ª sessão de quimioterapia com DOX.

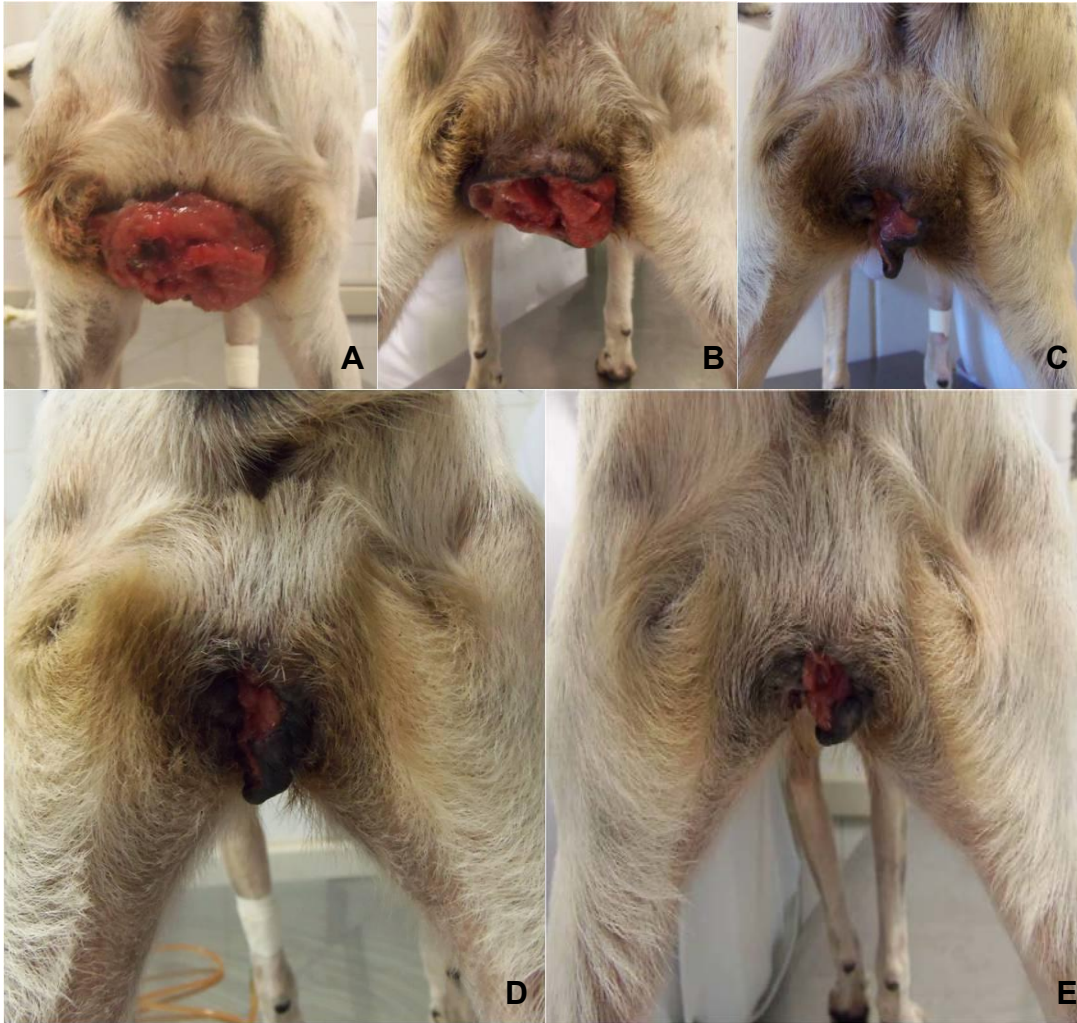


Figura 5: Imagem da lesão macroscópica sequencial do TVT em uma fêmea canina durante tratamento quimioterápico com DOX, que apresentou RP do tumor após o tratamento. **A:** aspecto do TVT antes do início do tratamento; **B:** lesão 21 dias após a 1ª sessão de quimioterapia; **C:** lesão 21 dias após 2ª sessão de quimioterapia; **D:** lesão 21 dias após 3ª sessão de quimioterapia e **E:** RP do tumor 21 dias após 4ª sessão com DOX.

Nota-se que a maioria dos valores das medidas tumorais não são iguais a zero após o término do tratamento (Quadros 7 e 8). Isso ocorreu devido à área com aparência hiperecogênica em sua maior parte, sugerindo presença de tecido cicatricial visualizado na imagem ultrassonográfica na região anteriormente ocupada pelo tumor, que ocorreu na maioria das cadelas (Figura 6).

Quadro 7: Medidas individuais dos tumores através de ultrassonografia durante diferentes momentos do tratamento de pacientes com TVT com doxorrubicina, Jaboticabal (SP), 2015.

Paciente	Medida do tumor em cm ² nos diferentes momentos				
	M0	M2	M4	M6	M8
1	16.4	1.2	0.9	1.1	0.8
2	13.8	6.8	1.2	0.1	0.1
3	32.3	27.2	4.1	2.8	0.7
4	12.8	1.9	1.0	2.6	0.9
5	15.3	2.4	2.3	3.7	1.2
6	10.7	2.6	1.0	0.0	0.0
7	14.4	9.8	13.9	4.3	1.8
8	17.4	3.7	2.2	2.2	0.8
9	3.4	1.7	0.8	0.6	0.6
10	8.6	6.1	2.8	1.6	0.7

Quadro 8: Média e desvio padrão das medidas dos tumores através de ultrassonografia durante diferentes momentos do tratamento de pacientes com TVT tratados com doxorrubicina, Jaboticabal (SP), 2015.

Momentos	Tumor em cm ²
M0	14.5 ± 7.4 ^A
M2	6.3 ± 7.8 ^B
M4	3.0 ± 3.9 ^B
M6	2.1 ± 1.3 ^B
M8	0.8 ± 0.4 ^B

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem os momentos entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).



Figura 6: Imagem ultrassonográfica representando área heterogênea em sua maior parte hipoeecogênica de limites definidos, medindo aproximadamente 1,36 x 0,64cm, localizada cranial à região vulvar, com aparência de tecido fibrótico 21 dias após 4ª sessão com doxorubicina.

2.3.5 Avaliação Cardíaca

Durante o tratamento, as pacientes foram submetidas a avaliações cardíacas antes de cada sessão quimioterápica com intuito de monitorar possíveis alterações causadas pela doxorubicina, em virtude do potencial cardiotoxico da DOXO. Todas as pacientes apresentaram valores eletrocardiográficos dentro da normalidade para a espécie e não houve alteração no ritmo cardíaco ao longo do experimento.

Com relação à ecodopplercardiografia, duas pacientes foram retiradas do experimento, pois apresentaram valores de função sistólica abaixo da normalidade (fração de encurtamento menor do que 25 %) e dilatação de câmaras cardíacas. Esse fato ocorreu em uma paciente que havia recebido duas aplicações de DOXO (dose cumulativa 60mg/m²), e em outra que havia recebido três aplicações de DOXO (dose cumulativa 90mg/m²). Em relação ao tumor, uma das pacientes que recebeu dose cumulativa de 60mg/m², apresentou remissão completa da massa, com citologia negativa para células neoplásicas. A paciente que recebeu dose cumulativa de 90mg/m² precisou de substituição do fármaco para dar sequência ao tratamento

até a remissão completa do tumor. Neste caso foi feito uso do sulfato de vincristina na dose de 0,75mg/m².

Todas as outras pacientes apresentaram função sistólica e tamanho das câmaras cardíacas normais durante o tratamento e após a última administração.

2.3.6 Efeitos Adversos Inespecíficos

Alguns eventos relacionados ao uso de doxorrubicina ocorreram durante o tratamento dos pacientes com TVT. Entre os efeitos observados, a perda de peso transitória, mais evidenciadas entre os momentos M2 e M4, normalizando-se gradativamente até o término do tratamento.

Apesar da ocorrência de perda de peso, não houve necessidade de intervenção, pois o valor não ultrapassou 10% do peso inicial (perda de peso grau 1, conforme estabelecido pelo VCOOG), indicando também que durante todo período de tratamento quimioterápico com DOX os animais se alimentaram adequadamente.

Clinicamente as pacientes mantiveram-se estáveis, sendo esporadicamente observados episódios de êmese e diarreia, entretanto, estes foram autolimitantes e ocorriam geralmente no segundo ou terceiro dia após a sessão quimioterápica.

2.4 DISCUSSÃO

A doxorubicina é um quimioterápico muito utilizado na rotina da oncologia veterinária, dessa forma, o conhecimento do perfil de toxicidade deste agente, permite seu uso com maior segurança, possibilitando evitar ou amenizar possíveis efeitos indesejáveis, garantindo melhor qualidade de vida do paciente durante o tratamento, além de aumento na sobrevida. Um estudo descrevendo este fato foi realizado por Vail (2009), relatando que o risco de morte associado à toxicidade dos quimioterápicos é menor que 1 em 200 animais, se houver intervenção apropriada.

Neste estudo, os valores da contagem global de eritrócitos, taxa de hemoglobina, volume globular, volume corpuscular médio e a concentração de hemoglobina corpuscular média das pacientes tratadas com dose cumulativa de 120mg/m^2 não revelaram diferença significativa entre os momentos avaliados, entretanto, a avaliação individual dos parâmetros eritrocitários das pacientes tratadas indicaram valores abaixo da referência para a espécie de até 20% em cada momento. Apesar disso, nenhuma cadela desenvolveu quadro clínico condizente com anemia, pois a redução dos valores no sangue periférico apresentou-se de forma sutil.

A supressão hematopoiética é a principal complicação que limita a posologia dos fármacos citostáticos e é confirmada principalmente por neutropenia, trombocitopenia e anemia, das quais as duas últimas ocorrem com menos frequência (GERSHENSON et al., 1987; SANTANA, 1988).

A depressão hematológica induzida pela doxorubicina, quando ocorre, normalmente é devida ao estímulo na produção de espécies reativas de oxigênio, em eritrócitos, resultando em lesões da membrana eritrocitária tal como reportam Young et al. (1981).

Segundo estudo de Dias et. al. (2003), a doxorubicina revelou-se um agente hematotóxico dose e tempo dependentes, por apresentar severa depressão hematológica onde os resultados do eritrograma revelaram contagem global de hemáceas, taxa de hemoglobina e volume globular significativamente inferiores àqueles obtidos no grupo controle principalmente nos animais que receberam maior dose cumulativa de doxorubicina, 270 mg/m^2 , porém este efeito não foi evidenciado

no grupo tratado com dose cumulativa total de 120 mg/m² de cloridrato de doxorrubicina, evidenciando que a hematotoxicidade da doxorrubicina é dose dependente. Esses resultados são semelhantes aos encontrados no presente estudo. Provavelmente a dose aqui utilizada corroborou para a ausência de hematotoxicidade notável no sangue circulante. Silva et al. (2004), também observaram redução significativa nos parâmetros eritrocitários em um grupo com sete cães que receberam dose cumulativa de doxorrubicina de 240mg/m², entretanto, os pacientes não chegaram a desenvolver anemia.

Durante o tratamento, em nenhum momento os pacientes desenvolveram trombocitopenia, permanecendo os valores dentro dos parâmetros de referência para a espécie. Em termos clínicos, a trombocitopenia associada à quimioterapia antineoplásica raramente é significativa a ponto de causar sintomatologia (LANA; DOBSON, 2010). Gershenson et al. (1987) e Santana (1988), também descreveram que esta alteração ocorre com menos frequência na utilização de citostáticos, quando comparada com a ocorrência de neutropenia. Neste projeto, foi dada grande importância a um controle rigoroso contra ectoparasitas, a fim de prevenir doenças que também pudessem levar ao quadro de trombocitopenia durante o tratamento quimioterápico antineoplásico dos pacientes.

Os resultados do leucograma apresentaram redução na contagem de leucócitos totais quando comparado ao valor basal, com maior evidência 14 dias após a 4ª sessão com doxorrubicina, momento no qual a queda foi significativa estatisticamente ($p=0,04$), com média próxima ao limite inferior à variação de normalidade para a espécie. Na contagem diferencial dos leucócitos foi observada uma redução progressiva de neutrófilos segmentados ao longo do tratamento, significativo ($p=0,01$) em M7. Essas alterações eram esperadas, pois a neutropenia representa frequentemente toxicidade associada à quimioterapia (SUSANECK, 1983; RODASKI; DE NARDI, 2008). O tempo de circulação na medula óssea de 6 dias, $t_{1/2}$ de 4-8 horas e um nadir de 5-10 dias dos neutrófilos, associada à ação mielossupressiva da maioria dos fármacos quimioterápicos antineoplásicos, faz com que seja um efeito frequente em oncologia (COUTO, 2008). Ahaus et al. (2000) constataram ocorrência de 69% de neutropenia em animais sujeitos a quimioterapia antineoplásica, com protocolos contendo doxorrubicina, independentemente do tipo

de neoplasia e 11% de neutropenia em protocolos com uso exclusivo da doxorrubicina. Cunha (2014) realizou um estudo em cães e gatos submetidos a diferentes protocolos quimioterápicos e encontrou 16 episódios de neutropenia em 10 animais (23,8%), ocorrendo 4,5% como neutropenia isolada; 0,4% em combinação com anemia; e 1,1% em combinação com anemia e trombocitopenia. Nossos dados concordam com os achados de Dias et. al. (2003), em que houve uma diminuição moderada, estatisticamente significativa ($p < 0,01$) na contagem global de leucócitos dos animais tratados com doxorrubicina. Nos animais que receberam dose cumulativa de 120 mg/m^2 , verificou-se a ocorrência de leucopenia discreta em alguns momentos do ensaio experimental, acompanhada pela recuperação no número de leucócitos após determinado período, assim como relatado também por Ogilvie et al. (1991).

A medula óssea é responsável pela produção de células da linhagem eritrocitária, leucocitária e megacariocítica (SANTOS, 2008), por este motivo, apresenta elevado índice mitótico e conseqüentemente é um alvo preferencial dos antineoplásicos (FRIMBERGIER, 2010; LANA; DOBSON, 2010). No presente estudo, entre os valores obtidos no mielograma, a contagem de rubríctos e metarrubríctos apresentou leve elevação progressiva ao longo do tratamento, com diferença significativa estatisticamente ($p = 0,02$ e $p < 0,001$ respectivamente). Pressupõe-se que esta alteração pode ser um aumento apenas relativo, uma vez que, por serem valores percentuais, a diminuição das células da série mieloide que foi observada, pode ter levado a um aumento da porcentagem de alguns componentes dos estádios evolutivos da série eritróide. Também pode ser devida a algum estímulo da produção de hemácias pela medula óssea, como hemorragia ou hemólise, a qual não foi detectada no hemograma.

A maioria dos animais deste experimento apresentavam tumor exuberante, com secreção serosanguinolenta e portavam esta afecção a um tempo relativamente longo antes de iniciarem o tratamento. A própria perda de sangue na secreção tumoral pode ter sido estímulo para o compartimento hematológico central em repor as células perdidas. Por se tratar de uma hemorragia crônica com uma possível resposta medular, os valores eritrocitários do sangue circulante não apresentaram alterações durante todo o período experimental.

No estudo de hipoplasia sanguínea de Dias et. al. (2003), foi verificada uma acentuada hipocelularidade relacionada aos estádios evolutivos do compartimento mitótico eritróide medular (proeritroblastos, eritroblastos basofílicos epolicromatofílicos), especialmente nos animais que receberam a doxorrubicina, 30 mg/m², a intervalos semanais (dose total de 270mg/m²). Estas alterações não foram observadas no presente estudo, muito provavelmente devido à dose cumulativa menor utilizada (120mg/m²) e o maior intervalo entre as aplicações (21 dias). Essa diferença mostra que, para minimizar os efeitos tóxicos sobre a medula óssea, principalmente sobre a linhagem eritróide, o intervalo de administração e dose total utilizado neste experimento são mais seguros.

As variáveis neutrófilos bastonetes e neutrófilos segmentados avaliados no mielograma demonstraram diferença significativa ($p=0,006$ e $p<0,001$ respectivamente) ao final do tratamento, apresentando menor contagem de células, o que também foi notado, de forma mais sutil, no sangue circulante. Provavelmente a alteração observada no compartimento periférico foi consequência da resposta medular ao citostático. Os granulócitos são células de renovação rápida com meia-vida mais curta, e devido a este fato são as primeiras células a demonstrarem as ações citotóxicas da doxorrubicina.

A relação M:E apresentou diminuição significativa ($p=0,001$) ao final do tratamento. Este resultado se deve a somatória de dois eventos observados: a hipoplasia granulocitária, essencialmente neutrofílica e ao aumento de alguns componentes eritróides, pois ambos os fatos levam a uma queda da relação M:E. Este resultado foi o oposto do relatado por Dias et. al. (2003), que observou uma supressão da eritropoiese e o incremento da granulopoiese observados na medula óssea de cadelas após aplicação de doxorrubicina, provavelmente devido a maior dose utilizada (270mg/m²) e menor intervalo entre as aplicações (semanal). O mecanismo principal de agressão tóxica da doxorrubicina sobre a medula óssea, traduz-se por destruição das células maduras e funcionais do compartimento de reserva, podendo, também, segundo DESLILE (1990), ocorrer destruição das células-tronco (*stem cell*).

No presente estudo essa agressão foi observada na linhagem mieloide, mas não ocorreu na linhagem eritróide, talvez devido à taxa de renovação um pouco mais

lenta desta última, cuja posologia aplicada no nosso tratamento ainda não foi suficiente para causar citotoxicidade eritrocitária. Segundo VCOG-CTCAE (2011), a classificação para efeitos sob a medula óssea e sangue periférico obtidos neste estudo, enquadram-se em grau 1 de toxicidade, representado por leve redução de celularidade.

A doxorrubicina é descrita por vários autores como frequente associação a reações alérgicas, resultantes da libertação massiva de histamina, por degranulação dos mastócitos (SHEPHERD, 2003; THAMM; VAIL, 2007; FRIMBERGER, 2010). Neste estudo, os efeitos alérgicos relacionados ao tratamento quimioterápico antineoplásico foram mínimos, classificados como grau 1 de acordo com VCOG-CTCAE (2011), relacionados somente com presença de vasculite local devido a administração de doxorrubicina, sem relação com extravasamento perivascular do fármaco. Em nenhum paciente houve necessidade de intervenção, entretanto, para minimizar essa ocorrência foi realizado um revezamento do membro utilizado para administração do antineoplásico entre cada sessão de quimioterapia. Não ocorreram casos de reações anafiláticas relacionadas ao uso de doxorrubicina nos pacientes avaliados. Para prevenção de reações de hipersensibilidade foi administrado difenidramina na dose de 1mg/kg, pela via intramuscular 15 minutos antes de cada sessão quimioterápica. Cunha, (2014) verificou reação alérgica em quatro dos 42 animais submetidos a diferentes protocolos de quimioterapia e afirmou que a doxorrubicina estava significativamente associada a este efeito.

Neste experimento, as variáveis creatinina e ALT apresentaram-se mais elevadas 21 dias após a primeira sessão de quimioterapia quando comparadas ao momento basal, entretanto, estes valores ainda se mantiveram dentro da normalidade quando comparados com os valores de referência para a espécie canina (WEISS; WARDROP, 2010). Os valores de AST foram decrescentes, principalmente 21 dias após a terceira e a quarta sessão com doxorrubicina. Apesar da diferença estatística, este resultado não tem significado clínico, pois todos os valores bioquímicos permaneceram dentro dos parâmetros de referência para a espécie canina. Resultados semelhantes foram encontrados por Cunha, (2014), que também não identificou casos de nefro ou hepatotoxicidade em cães e gatos submetidos a diferentes quimioterápicos.

A concentração de albumina sérica apresentou elevação ao decorrer dos momentos avaliados, entretanto, este aumento pode estar relacionado à mudança de dieta (WEISS; WARDROP, 2010), proporcionada aos pacientes durante o tratamento, pois sete dos dez pacientes deste estudo apresentavam carência nutricional que foram corrigidas através de alimentação balanceada proposta ao longo do tratamento. As alterações encontradas nos efeitos metabólicos relacionados à quimioterapia antineoplásica em cães, neste estudo, classificam-se em grau 1, conforme estabelecido pelo VCOG-CTCAE, (2011).

Antes de cada sessão quimioterápica, foi realizada mensuração do tumor através de ultrassonografia, verificando redução expressiva no diâmetro da massa. Ao término do tratamento, todas as cadelas passaram por exame citológico de swab vaginal para confirmação de ausência de células neoplásicas. Entretanto, mesmo após a remissão completa do tumor, as imagens ultrassonográficas apresentavam alterações compatíveis com fibrose na região onde antes era ocupada pelo tumor.

Em 2009, Neuwald realizou um estudo em 25 cães com diferentes tipos de neoplasias, sendo um deles portador de TVT recidivante fazendo-se necessária dose cumulativa de 150mg/m^2 para promover resultado de swab vaginal negativo para células neoplásicas. Em nosso estudo, a remissão do TVT foi completa em nove dos dez cães submetidos ao tratamento com doxorrubicina na dose cumulativa de 120mg/m^2 . Com relação ao paciente que apresentou remissão parcial após o tratamento, foi necessária a realização de um tratamento mais prolongado com sulfato de vincristina até a obtenção da remissão completa do tumor.

Em decorrência do potencial cardiotoxico já conhecido da doxorrubicina, durante o tratamento, as pacientes foram submetidas às avaliações cardíacas antes de cada sessão quimioterápica com intuito de monitorar possíveis alterações causadas pelo fármaco. Todas as pacientes apresentaram valores eletrocardiográficos dentro da normalidade para a espécie e não houve alterações no ritmo cardíaco ao longo do experimento.

O aumento das câmaras cardíacas e a diminuição da função sistólica visibilizadas na ecodopplercardiografia em duas pacientes confirmaram a eficiência desse exame na detecção da cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina. Assim sendo, elas foram retiradas do experimento, pois tinham suas frações de

encurtamento entre 20 e 25 %, porém sem desenvolvimento de sinais clínicos de insuficiência cardíaca congestiva. Ambas as pacientes foram acompanhadas posteriormente, onde em uma delas não houve necessidade de prosseguir com outro tratamento quimioterápico, pois a dose cumulativa de 60mg/m² recebida foi suficiente para remissão completa do tumor. Na outra paciente que recebeu dose cumulativa de 90mg/m² realizou-se substituição da DOXO pelo sulfato de vincristina, na dose de 0,75mg/m², até a remissão completa do tumor (6 sessões com intervalos semanais).

Alterações cardíacas também foram observadas por SILVA et al. (2005) em estudo ecodopplercardiográfico em cães submetidos ao tratamento com doxorrubicina, mostrando que a maior parte dos pacientes apresenta essa alteração quando é necessário o uso de cinco sessões ou mais. No presente trabalho, essas alterações não foram observadas na maioria dos pacientes, pois as cadelas receberam apenas quatro sessões (atingindo a dose cumulativa de 120 mg/m²).

Outros sinais observados, associados à administração de doxorrubicina foram diarreia, emese, perda de peso transitória, letargia moderada, causando leve dificuldade nas atividades de vida diária das pacientes, variando entre grau 1 e 2 de acordo com classificação para efeitos colaterais inespecíficos relacionados à quimioterapia antineoplásica do VCOG-CTCAE (2011). Apesar disso, esses efeitos foram autolimitantes em todas as pacientes submetidas ao tratamento, não ocorrendo maiores repercussões.

Observamos neste estudo que a presença de efeitos adversos relacionados à quimioterapia é uma realidade vista na rotina da oncologia, entretanto, o monitoramento constante e o manejo adequado dos pacientes, possibilitam que as implicações mais comuns sejam minimizadas, proporcionando assim uma maior qualidade de vida dos pacientes durante o tratamento quimioterápico antineoplásico com doxorrubicina.

2.5 CONCLUSÃO

De acordo com o presente estudo é possível concluir:

- A toxicidade hematológica, principalmente as neutropenias transitórias foram frequentes nos pacientes submetidos à quimioterapia com doxorubicina, demonstrando ser de grande importância a realização do hemograma e avaliação física antes de cada sessão para garantir que, caso haja necessidade sejam tomadas medidas de correções evitando repercussões mais graves.
- O monitoramento cardíaco através de ecodopplercardiografia demonstrou eficiência na detecção da cardiomiopatia induzida pela doxorubicina, comprovando a grande importância deste exame previamente às sessões de quimioterapia com o fármaco aqui estudado.
- No presente estudo, a doxorubicina induziu a cardiotoxicidade.
- Neste estudo a toxicidade gastrointestinal apresentou-se de forma branda e sem complicações mais graves.
- A doxorubicina é um fármaco que apresenta toxicidade, porém neste experimento estes efeitos foram tolerados pelos pacientes.
- A doxorubicina foi eficaz no tratamento do tumor venéreo transmissível.
- Mais estudos são necessários para melhor conhecimento do perfil de toxicidade do cloridrato de doxorubicina.

2.6 REFERÊNCIAS

AHAUS, E. A; COUTO, C. G; VALERIUS, K. D. Hematological toxicity of doxorubicin-containing protocols in dogs with spontaneously occurring malignant tumors. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Ithaca, v. 36, p. 422-426, 2000.

COHEN, D.: The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. **Advances in Cancer Research**, New York, v. 43, p. 75–112, 1985.

COUTO, C. G. Oncology. In NELSON R.W.; COUTO C. G. (Ed.), **Small animal internal medicine** 4th ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2008. p. 1143 – 1195.

CUNHA, E. F. G. **Avaliação dos efeitos secundários dos fármacos quimioterápicos em animais de companhia - estudo retrospectivo**. Dissertação de Mestrado integrado em medicina veterinária, Lisboa, 2014.

DAS, U.; DAS, A.K. Review of Canine Transmissible Venereal Sarcoma. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v.24, p. 545-556, 2000.

DESLILE, F. Chimiotherapie anticancéreuse. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, Paris, v.166, n.1, p.1009-22, 1990.

DIAS, M. A; SANTANA, A. E; SOBREIRA, M. R. F; FILHO, E. C. Estudo de um modelo animal de hipoplasia Sanguínea induzida pelo agente Antineoplásico doxorubicina (adriblastina®). **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 3, p. 246-253, 2003.

FRIMBERGUER, A. E. Principles of chemotherapy. In ETTINGER S.J.; FELDMAN E.C (Ed.). **Text book of veterinary internal medicine** 7th ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2010. p. 2121-2126.

GERARDI, D. G. Mecanismos de resistência aos quimioterápicos. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**, São Paulo. Roca, 2008. cap. 10, p. 179-194.

GERSHENSON, D.M. High dose doxorubicin infusion therapy for dissiminated mixed mesodermal sarcom of the uterus. **Cancer**, New York, v. 59, n. 7, p. 1264-7, 1987.

KARLSON, A. G.; MANN, F. C.: The transmissible venereal tumor of dogs: observations on forty generations of experimental transfers. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Boston, v. 546, p.1197–1213, 1952.

LANA, S. E; DOBSON, J. M. Principles of chemotherapy, In DOBSON J.M.; LASCELLES B.D.X. (Ed) BSAVA manual of canine and feline oncology. 3rd ed. p. 60-79. Gloucester, **British Small Animal Veterinary Association**, 2010.

MURCHISON, E. P.; WEDGE, D.C.; ALEXANDROV, L. B.; FU, B.; MARTINCORENA, I.; NING, Z.; TUBIO, J. M.: Transmissible dog cancer genome reveals the origin and history of an ancient cell lineage. **Science**, Whashington, v. 343, n. 6169) p. 437 – 440, 2014.

NEUWALD, E. B. **Avaliação hematológica, bioquímica e eletrocardiográficas de cães com diferentes neoplasias tratados com doxorrubicina**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre: 2009.

OGILVIE, G.K. Weekly administration of low-dose doxorubicin for treatment of malignant lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v.18, n.10, p.1762-64, 1991.

POWELL, W. C. Contagious growths in dog. **British Medical Journal**, London, v. 2, p. 176 - 177, 1902.

RODASKI, S.; DE NARDI, A.B; **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. São Paulo: MedVet, 2008. p. 115.

SAID, R. A; SILVA, L. F; ALBUQUYERQUE, A. R. O. L; SOUZA-NETA, E. M; LAVINSKY, M. O: Efficacy and Side Effects of Vincristine Sulphate Treatment on Canine Transmissible Venereal Tumour. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, São Paulo, 2009.

SANTANA, A E. **Benzenismo experimental: desenvolvimento da medula óssea ectópica**. Tese (Doutorado em Fisiologia). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1988.

SANTOS, M. F. Hemocitopoese. In: JUNQUEIRA L.C; CARNEIRO J. (Ed.). **Histologia básica**. 11th ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SHEPHERD, G. M. Hypersensitivity Reactions to Chemotherapeutic Drugs. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, Totowa, v. 24, n. 3, p. 253-262, 2003.

SILVA, C. E. V.; CAMACHO, A. A. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 3, p. 300-306, 2005.

SOUSA, J.; SAITO, V.; NARDI, A.B.; RODASKI, S.; GUÉRIOS, S.D.; BACILA, M. A survey on the incidence and the therapeutic procedures of the canine transmissible venereal tumor, the sticker's lymphosarcoma. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.5, p.41-48, 2000.

STRAKOVA, A.; MURCHISON, E. P. The changing global distribution and prevalence of canine transmissible venereal tumour. **Veterinary Research**, Paris, v. 10, p.168, 2014.

SUSANECK, S.J.; Doxorubicin therapy in the dog. **Journal American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v.182, n.1, p.70-72, 1983.

THAMM, D. H; VAIL, D. M. Aftershocks of cancer chemotherapy: managing adverse effects. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Itaca, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2007.

TINUCCI-COSTA, M. Tumor venéreo transmissível canino. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2008. cap. 34, p. 540-551.

VAIL, D. M. Supporting the veterinary cancer patient on chemotherapy: neutropenia and gastrointestinal toxicity. **Topics in Companion Animal Medicine**, New York, v. 24, n.3, p. 122-129, 2009.

VETERINARY COOPERATIVE ONCOLOGY GROUP – common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v. 1, p. 1, 2011.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology** 6th ed. Ames: Wiley – Blackwell, 2010.

WITHROW, S.J.; **Small animal clinical oncology**. Philadelphia: Ed. W.B. Saunders, 2013. p. 844.

APÊNDICES

APÊNDICE A

1A. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DA PESQUISA: TOXICIDADE ACUMULATIVA DO CLORIDRATO DE DOXORRUBICINA NO TRATAMENTO DE CADELAS COM TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL

Pesquisadora: Mestranda Rafaela Bortolotti Viéra – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal – SP.

Orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi.

Coorientadora: Profa. Dra. Annelise Carla Camplesi

Responsável clínico: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

Observações: Projeto Integrado da Faculdade de Ciências Farmacêutica de Araraquara, UNESP e da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP.

Objetivo da pesquisa: Esta pesquisa tem como objetivo avaliar os parâmetros de toxicidade hematológicos, bioquímicos, mielotoxicidade e resposta do tumor à quimioterapia.

Procedimento: Os procedimentos deste estudo serão realizados no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP) “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal – SP. Durante todo o período de tratamento, os animais ficarão alojados no canil da instituição, recebendo água e ração Granplus (Guabi®) *ad libitum*, com monitoramento constantemente pela equipe do projeto.

Riscos aos animais: A doxorubicina é um quimioterápico amplamente utilizado na clínica humana e veterinária, podendo atuar não somente nas células tumorais como nas células saudáveis, dessa forma os animais poderão apresentar os efeitos tóxicos sobre o coração, células vermelhas e brancas do sangue.

Benefícios: ao participar desta pesquisa os animais receberão monitoramento constante e quimioterapia para tratamento do tumor, isento dos custos.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, Residente na
 rua....., nº.....,
 Bairro....., na Cidade de
 declaro que em/...../..... Concordei voluntariamente com a participação de meu cão
, no projeto de pesquisa acima referido. Fui devidamente informado em detalhes
 pelo pesquisador responsável que:

- O estudo implica que meu animal será submetido a procedimentos, exames complementares e tratamentos devidamente planejados, cujos eventuais riscos me foram explicados;
- O animal ficará internado no Hospital Veterinário durante todo o período de tratamento;
- O medicamento utilizado - doxorubicina - poderá produzir efeitos tóxicos ao músculo cardíaco e danos graves à medula óssea que causarão extensa diminuição das células sanguíneas.
- O animal poderá apresentar diarreia, vômito, alopecia, nefrotoxicidade e reações anafiláticas.
- Meu animal não é obrigado a continuar participando do projeto e ele poderá, a qualquer momento, ser excluído da pesquisa por minha decisão, sem que isso o impeça de receber o tratamento convencional.
- A pesquisa não será feita se houver risco para o meu animal. Da mesma forma, caso algum risco proibitivo venha a se revelar no decurso do estudo, os pesquisadores se comprometem a me alertar sobre o fato e a suspender de imediato a participação do animal como paciente.

Assim declaro que fui informado (a) sobre todos os procedimentos que meu animal irá receber durante a pesquisa, de forma clara e objetiva e todas as informações serão mantidas em sigilo.

Declaro que fui informado que posso retirar o(s) animal(is) a qualquer momento do estudo.

 Proprietário do Animal
 (Assinatura e RG)

 Pesquisador Responsável
 (Assinatura e CRMV)

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

Contato da Pesquisadora Responsável:
 Rafaela Bortolotti Viéra - (16) 9394-5176

APÊNDICE B

1B. Etapas para obtenção do aspirado de medula óssea esternal.

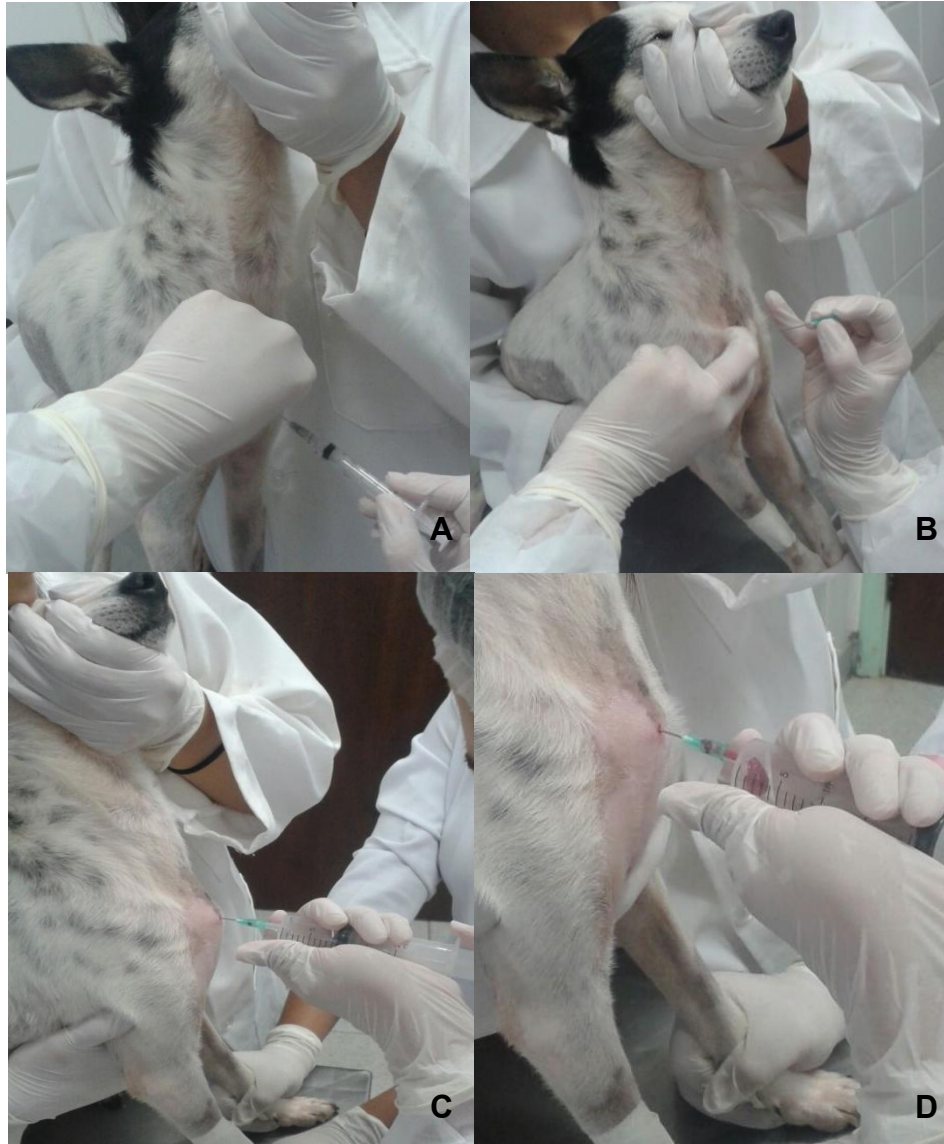


Figura 7: **A:** aplicação do botão anestésico com lidocaína na região do manúbrio do esterno; **B:** posicionamento para introdução da agulha (25x8); **C:** acoplamento da seringa contendo EDTA na agulha para realizar punção; **D:** obtenção do material (medula óssea).

APÊNDICE C

1C. Tabela de parâmetros macroscópicos para avaliação clínica da resposta ao tratamento quimioterápico.

Termo	Abreviação	Descrição
Remissão ou resposta completa	RC	Desaparecimento completo do tumor e sinais da doença.
Remissão ou resposta parcial	RP	Diminuição do volume do tumor $\geq$ 50% ou diminuição do diâmetro máximo de tumor $> 30\%$.
Doença estável	DE	Nenhum aumento ou diminuição do tamanho do tumor ou sinais da doença (por exemplo, $\pm 20\%$ mudanças de diâmetro).
Doença em progressão	DP	Aumento do volume do tumor $> 25\%$ ou um aumento de diâmetro máximo de tumor $>20\%$; aparecimento de novas lesões.

Adaptado: Whitrow, 2013.

APÊNDICE D

1 D. Principais tabelas sobre critérios de terminologia para eventos adversos após a quimioterapia antineoplásica em cães e gatos, adaptadas do consenso : Veterinary cooperative oncology group – common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1, 2011.

D. 1 Classificação para efeitos sob a medula óssea/ sanguíneos em decorrência da quimioterapia antineoplásica.

Efeitos sob a medula óssea/sanguíneos					
Efeito adverso	Grau				
	1	2	3	4	5
Celularidade da medula óssea	Levemente hipocelular, <25% de redução da celularidade normal de acordo com a idade	Moderadamente hipocelular, >25-<50% de redução da celularidade normal de acordo com a idade	Hipocelularidade severa, >50% de redução da celularidade normal de acordo com a idade	-	-
Hemoglobina	Cão: 10 g/dl-<LIN* Gato: 8.0 g/dl-<LIN*	Cão: <10-8.0 g/dl Gato: <8.0-6.5 g/dl	Cão: <8.0-6.5 g/dl Gato: <6.5-5.0 /dl	Cão: <6.5 g/dl Gato: <5.0 g/dl	-
Hematócrito (volume globular)	Cão: 30%-<LIN*, Gato: 25%-<LIN*	Cão: 25-<30% Gato: 20-<25%	Cão: 20-<25% Gato: 15-<20%	Cão: <20% Gato: <15%	-
Neutropenia	1,500/ µL -<LIN*	1,000-1,499/µL	500-999/ µL	<500/ µL	-
Trombocitopenia	100,000/ µL -<LIN*	50,000-99,000/ µL	25,000-49,000/ µL	<25,000/ µL	-
Outro (especificar, ____)	Leve	Moderado	Severo	Chance de óbito, incapacidade	Morte

*LIN – limite inferior de normalidade

D. 2 Classificação para efeitos alérgicos/ imunogênicos relacionados ao tratamento quimioterápico antineoplásico.

Efeitos alérgicos/ imunogênicos					
Efeito adverso	1	2	Grau 3	4	5
Reação alérgica / hipersensibilidade	Urticária transitória	Erupções cutâneas, urticária, dispneia	Hipotensão sintomática, com ou sem urticária, medicações parenterais são necessárias, edema	Anafilaxia com medicação parenteral necessária	Morte
Reação autoimune	Reações autoimunes assintomáticas, sorológicas ou qualquer outra evidência, com função orgânica normal e sem indicação de intervenção	Evidência de reação autoimune envolvendo um órgão ou uma função não vital (ex. Hipotireoidismo)	Reação reversível envolvendo um órgão de função vital ou outro efeito adverso associado (ex., colite transitória ou anemia)	Reação autoimune com consequências potencialmente fatais	Morte
Vasculites (não inclui injeção perivascular de fármacos)	Leve, intervenção não indicada	Sintomático, intervenção com AINES* é indicada	Indicação de corticoesteróides	Lesões isquêmicas, indicação de amputação ou debridamento cirúrgico	Morte
Outro (especificar, ___)	Leve	Moderado	Severo	Chance de óbito, incapacidade	Morte

*AINE, antiinflamatório não esteroide

D. 3 Classificação para efeitos metabólicos relacionados à quimioterapia antineoplásica em cães.

Efeito adverso	Efeitos Metabólicos				
	1	2	Grau 3	4	5
Albumina baixa	<LIN–2.0 g/dl	<2.0–1.5 g/dl	<1.5 g/dl	--	--
Fosfatase alcalina	>LSN–2.5_LSN	>2.5–5.0_LSN	>5.0–20_LSN	>20_LSN	--
ALT	>LSN–1.5_LSN	>1.5–2.0_LSN	>2.0–10_LSN	>10_LSN	--
AST	>LSN–1.5_LSN	>1.5–2.0_LSN	>2.0–10_LSN	>10_LSN	Morte
Creatinina	>LSN–1.5_LSN	>1.5–2.0_LSN	>2.0–3_LSN	>3_LSN	Morte
Outro (especificar,___)	Leve	Moderado	Severo	Risco de óbito, incapacidade	Morte

*LIN: Limite inferior da normalidade *LSN: Limite superior da normalidade

D. 4 Classificação para efeitos colaterais inespecíficos relacionados à quimioterapia antineoplásica.

Efeitos colaterais inespecíficos					
Efeito adverso	1	2	Grau 3	4	5
Letargia / fadiga	Letargia leve	Letargia moderada causando alguma dificuldade de AVD	Comprometimento, severa restrição de AVD, paciente consegue caminhar só para realizar AVD	Incapacidade; necessitam de alimentação forçada e auxílio para desenvolver AVD	Morte
Febre (na ausência de neutropenia de grau 3 ou 4)	1°C acima do LSN	1 a 2 °C acima do LSN	2 a 3 °C acima do LSN	>3°C acima do LSN	Morte
Hipotermia	-	33 a 36 °C	28 a 33 °C	<28 °C ou consequências que levam ao risco de óbito (ex., coma, hipotensão, edema pulmonar)	Morte
Perda de peso	5-10% do peso inicial, intervenção não indicada.	>10-20% do peso inicial, suporte nutricional indicado	>20% do peso inicial	-	Morte
Outro (especificar,___)	Leve	Moderado	Severo	Risco de óbito, incapacidade	Morte

LSN- limite superior de normalidade ; AVD- atividade de vida diária (comer, dormir, defecar e urinar)

APÊNDICE E

Valores de referência para exames hematológicos e bioquímicos em cães, adaptados de WEISS; WARDROP 2010.

E. 1 Valores de referência para eritrograma e plaquetas em cães.

Valores eritrocitários e plaquetários de referência						
Eritrograma						
Espécie	HE	HB	HT	VCM	CHCM	PLAQ.
	x 10 ⁶ /μL	g/ dL	%	fL	g/ dL	x 103/μL
Canina	5,5 - 8,5	12 - 18	37 - 55	60 - 77	31 - 34	180 - 400

E. 2 Valores de referência para leucograma em cães.

Parâmetros Leucocitários de referência para cães						
Leucócitos Totais x10 ³ /uL	Contagem diferencial %					
	Bas	Eos	Bast	Seg	Linf	Mon
	00 - 01	2 - 10	0 - 3	60 - 77	13 - 30	3 - 10
6 – 18	Contagem absoluta x10 ³ /uL					
	Bas	Eos	Bast	Seg	Linf	Mon
	0 - 0	0,12 – 1,8	0 – 0,5	3,6 – 13,8	0,72 – 5,4	0,18 – 1,8

E. 3 Valores de referência para parâmetros bioquímicos sanguíneos em cães.

Bioquímicos – valores de referência para cães						
Uréia mg/dL	Creat. mg/dL	PT g/ dL	Albumina U/L	AST U/L	ALT U/L	FA U/L
15 - 65	0,5 - 1,5	5,8 - 7,9	2,6 - 4,0	10 - 88	10 - 88	20 - 150