MARINA CIVITA

**Avaliação da cimetidina como tratamento de melanomas em
equinos tordilhos**

São Paulo

2017

MARINA CIVITA

Avaliação da cimetidina como tratamento de melanomas em equinos tordilhos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Profa. Dra. Carla Bargi Belli

São Paulo
2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3531
FMVZ

Civita, Marina

Avaliação da cimetidina como tratamento de melanomas em equinos tordilhos.
/ Marina Civita. -- 2017.
70 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Carla Bargi Belli.

1. Pelagem Tordilha. 2. Melanoma. 3. Cimetidina. I. Título.

COMISSÃO DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da cimetidina como tratamento de melanomas em equinos tordilhos", protocolada sob o CEUA nº 2482070715, sob a responsabilidade de **Carla Bargi Belli e equipe; Carla Bargi Belli; Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes; Marina Civita** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 06/10/2016.

We certify that the proposal "Evaluation of cimetidine as a form of treatment of melanoma in Grey horses", utilizing 60 Equines (30 males and 30 females), protocol number CEUA 2482070715, under the responsibility of **Carla Bargi Belli and team; Carla Bargi Belli; Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes; Marina Civita** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/06/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **09/2015** a **10/2017**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem:

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Machos**

idade: **a**

N: **30**

Linhagem: **N/A**

Peso: **a**

Origem:

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **a**

N: **30**

Linhagem: **N/A**

Peso: **a**

Resumo: Avaliar a cimetidina como tratamento de melanoma em região ventral de cauda e períneo, com tamanho máximo de 5cm em animais tordilhos, machos ou fêmeas, entre 7 e 20 anos. A cimetidina será administrada por via oral, na dose de 18mg/kg BID por um período de 90 dias e, após o término, os animais serão monitorados por um período de 6 a 18 meses.

Local do experimento:

São Paulo, 29 de junho de 2017

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CIVITA, Marina

Título: Avaliação da cimetidina como tratamento de melanomas em equinos tordilhos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus queridos pacientes equinos, cuja beleza, pureza e docilidade encantarão a raça humana eternamente.

“There is something about the outside of a horse that is good for the inside of a man”

Sir Winston Churchill

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e acima de todas as coisas, agradeço aos meus dois filhos maravilhosos, Sophia e Leonardo, cujo amor, paciência e apoio foram fundamentais para chegar onde estou hoje. Eles me mostraram que acreditar e nunca desistir dos sonhos em momentos de tempestade são os caminhos mais árduos, mas que trazem a tão esperada recompensa. Sem eles, certamente nada teria sentido.

Aos meus grandes amigos Alan e Allana, que ofereceram seu valioso tempo e contribuição diária apenas pelo fato de serem meus queridos amigos. Sem seu suporte, este trabalho não existiria.

Agradeço à minha orientadora Dr^a Carla Bargi Belli, que admiro e tenho imenso carinho desde a época de minha graduação. Obrigada por acreditar em mim e me aceitar como sou.

A Dr^a Cristina Massoco Salles Gomes, que disponibilizou o Laboratório de Patologia para processamento das amostras e cuja alegria e tranquilidade sempre me contagiaram após nossas conversas.

A grande contribuição da Fazenda do Instituto Butantã, da Cavalaria de São Paulo e de todos os colegas e funcionários que me receberam, por abrirem suas portas e cederem seus animais para este estudo.

Ao meu amigo e mestre da matemática, Pedro, que entendeu que eu precisava mais do que um simples professor e me ajudou a desvendar a magia da estatística nas nossas super aulas.

A minha querida Dr^a Alma Hoge. Não preciso de palavras para dizer que sempre terá um lugar no meu coração.

Finalmente, aos meus filhos de quatro patas, que me proporcionaram colo, me encheram de amor incondicional e me fizeram companhia dia e noite nesta longa jornada de trabalho e total dedicação.

RESUMO

CIVITA, M. **Avaliação da Cimetidina como Tratamento de Melanomas em Equinos Tordilhos**. [Evaluation of Cimetidine as Treatment for Melanomas in Grey Horses]. 2017. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Os objetivos deste trabalho foram os de avaliar a eficácia da cimetidina como única forma de tratamento para reduzir o tamanho de melanomas localizados em região ventral de cauda e períneo em equinos tordilhos, determinar a eficácia da droga no controle do aparecimento de novas formações nas mesmas regiões e avaliar a duração do tratamento com cimetidina após a sua suspensão com relação à manutenção da redução de tamanho e do aparecimento de novas formações. Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizados 32 equinos tordilhos, sem restrições de raça ou sexo, com idade entre sete e 30 anos, com melanomas em região de cauda e períneo de até 5,0 cm de diâmetro e sem histórico anterior de tratamento com cimetidina ou procedimento cirúrgico para esta finalidade. Os animais foram divididos em dois grupos: 21 animais no grupo tratamento que receberam 18 mg/kg de cimetidina por via oral, BID durante noventa dias e 11 animais no grupo controle, que não receberam nenhuma medicação ou placebo. Os equinos foram avaliados quinzenalmente durante o período de tratamento e monitorados mensalmente durante 150 dias após o término da administração da droga. A cimetidina, na dose de 18 mg/kg VO BID, apresenta ação sobre os melanomas em equinos tordilhos, mas sua ação mostrou-se bastante variável e individual, além de não apresentar efetividade na manutenção da redução do volume após o término do tratamento.

Palavras-chave: Pelagem Tordilha. Melanoma. Cimetidina.

ABSTRACT

CIVITA, M. **Evaluation of Cimetidine as Treatment for Melanomas in Grey Horses.** [Avaliação da Cimetidina como Tratamento de Melanomas em Equinos Tordilhos]. 2017. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The purpose of this study was to evaluate the efficacy of cimetidine as treatment for melanoma present in the perineal area and ventral tail of Grey horses. Reduction in tumor volume and the capability of the drug to control the appearance of new nodules were evaluated. Thirty two grey horses with ages ranging between sete and 30 years and no predilection of breed or gender were used in this study. All the animals selected had no attempted treatment prior to this study. The animals were divided in two groups: the treatment group, consisting of 21 horses and the control group consisting of 11 animals. Cimetidine was administered at a dosage of 18 mg/kg orally twice a day for a total of ninety days. During the lenght of treatment, the group was evaluated every two weeks, and all the animals were monitored once a month for another 150 days after the end of therapy. The efficacy of the treatment with cimetidine was observed in 11 animals of the treatment group which showed size reduction of the masses during the drug administration period followed by a slight increase and stabilization at lower volumes than the initial measures. In addition, the animals that responded to the treatment presented a very variable and individual response.

Keywords: Grey Horse. Melanoma. Cimetidine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Caracterização molecular do locus da mutação causadora de despigmentação em equinos.....	18
Figura 2 -	Animal selecionado da Cavalaria de São Paulo (A) e animais da Fazenda do Butantã (B).....	29
Figura 3 -	Mensuração das formações com paquímetro digital.....	30
Figura 4 -	Imagens das formações antes (A) e depois de mapeados (B).....	31
Figura 5 -	Administração da cimetidina por via oral.....	32
Gráfico 1 -	Evolução da variação média do volume das formações tomadas isoladamente (Grupos Tratamento e Controle).....	37
Gráfico 2 -	Evolução da variação média da soma do volume das formações por cavalo (Grupos Tratamento e Controle).....	38
Gráfico 3 -	Evolução do volume total das formações ao longo do experimento (Grupos Tratamento e Controle).....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Comparação das médias entre os grupos Tratamento e Controle.....	36
Tabela 2 -	Comparação das médias entre os cavalos Jovens e cavalos Idosos.....	39
Tabela 3 –	Comparação das médias entre os cavalos da Cavalaria e do Butantã - Grupo Tratamento.....	40
Tabela 4 –	Intervalos de confiança das médias dos parâmetros e predição para um cavalo isolado – Grupo Tratamento.....	41
Tabela 5 –	Intervalos de confiança das médias dos parâmetros e predição para um cavalo isolado – Grupo Controle.....	42
Tabela 6 –	Compilação de novas formações – Grupo Controle.....	43
Tabela 7 –	Compilação de novas formações – Grupo Tratamento.....	44
Tabela 8 –	Compilação de formações desaparecidas ao longo do experimento.....	45
Tabela 9 –	Comparação do volume total de formações no início e ao final do experimento (Grupos Tratamento e Controle)	45
Tabela 10 –	Evolução da soma dos volumes das formações por cavalo – Grupo Tratamento.....	47
Tabela 11 –	Variação percentual da soma de volume das formações por cavalo nos três tempos principais – Grupo Tratamento.....	48
Tabela 12 –	Evolução da soma dos volumes das formações por cavalos – Grupo Controle.....	49
Tabela 13 –	Variação percentual da soma de volume das formações por cavalo nos três tempos principais – Grupo Controle.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
CD3+	Linfócito T periférico
CD4+	Linfócito T helper
CD57+	Natural killer
GDF15	Fator de Diferenciação de Crescimento 15
H ₁ R	Receptor de Histamina 1
H ₂ R	Receptor de Histamina 2
HDC	L-histidina decarboxilase
HIF-1 α	Fator Indutor de Hipóxia 1 Alfa
IFN γ	Interferon Gama
IL10	Interleucina 10
IL15	Interleucina 15
NM	Não Mensurável
NR4A3	Membro 3 do Grupo A da Subfamília 4 de Receptores Nucleares
RACK1	Receptor for activated C kinase 1
STX17	Syntaxin-17
TGF- β	Fator de Crescimento Tumoral Beta
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Treg	Linfócitos T reguladores

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
3	OBJETIVOS	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	SELEÇÃO DOS ANIMAIS	28
4.2	PROCEDIMENTOS DE MENSURAÇÃO E COLETA	29
4.3	PESAGEM E ADMINISTRAÇÃO DA CIMETIDINA	31
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5	RESULTADOS	34
6	DISCUSSÃO	51
6.1	DIFICULDADES E LIMITAÇÕES DO MÉTODO	51
6.2	COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS TRATAMENTO E CONTROLE	52
6.3	COMPARAÇÃO ENTRE CAVALOS JOVENS E IDOSOS	54
6.4	COMPARAÇÃO ENTRE BUTANTÃ E CAVALARIA.....	55
6.5	INTERVALO DE CONFIANÇA PARA O GRUPO TRATAMENTO	56
6.6	AVALIAÇÃO DO VOLUME TOTAL DE FORMAÇÕES.....	57
6.7	SURGIMENTO DE NOVAS FORMAÇÕES – GRUPO CONTROLE	57
6.8	SURGIMENTO DE NOVAS FORMAÇÕES – GRUPO TRATAMENTO	58
6.9	RESPOSTA DOS ANIMAIS AO TRATAMENTO	58
7	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICE	69

1 INTRODUÇÃO

O melanoma é uma neoplasia cutânea comum em equinos que afeta, em sua grande maioria, animais tordilhos e brancos (MOORE et al., 2013). Ele representa de 3,8 a 15% do total das neoplasias em equinos (SUNDBERG et al., 1977). Ao menos 80% dos cavalos tordilhos com mais de 15 anos irão desenvolver melanoma em um ou vários locais, sendo que 100% dos animais apresentarão tumores caso cheguem a viver o bastante para tal (McFADYEAN, 1933).

Uma série de estudos realizados em diversas raças demonstram que os locais mais comuns de aparecimento dos tumores são a região ventral da cauda e a região perineal, seguidas pelo prepúcio, comissura labial e pálpebras (FLEURY et al., 2000a; SELTENHAMMER et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2013).

Pesquisas iniciais descrevem o melanoma equino como sendo uma neoplasia benigna, uma simples alteração no armazenamento da melanina, ou uma displasia de pigmentação celular. O seu crescimento apresenta-se lento, necessitando de muitos anos para atingir 10 cm de tamanho (FLEURY et al., 2000b). Recentemente, o conceito de que este tipo de neoplasia tem potencial para malignidade tem sido aceito (PHILLIPS; LEMBCKE, 2013). Segundo Scott e Miller (2011), ao menos 2/3 (66%) dos tumores eventualmente se tornarão malignos. Em uma minoria de casos, os tumores são altamente malignos e disseminam-se rapidamente pelas vias hematógica e linfática (VALENTINE, 1995). O desenvolvimento de metástase, mesmo sendo relativamente incomum em casos de melanoma, deve sempre ser considerado em equinos tordilhos com mais de 10 anos de idade que apresentem qualquer alteração clínica (MacGILLIVRAY; SWEENEY; DEL PIERO, 2002).

Um dos tratamentos recomendados na literatura é a excisão cirúrgica das formações com remoção completa do tecido tumoral com margem de segurança, o que é efetivo principalmente em lesões pequenas e benignas (PHILLIPS; LEMBCKE, 2013). Porém, a decisão da remoção das formações através de cirurgia depende de diversos fatores como: taxa de crescimento dos melanomas, idade do paciente, presença ou ausência de necrose e infecção, comprometimento funcional e potencial para futuras complicações (GROOM; SULLINS, 2017). O tipo de melanoma envolvido, seu tamanho e localização também são importantes para decidir qual o tratamento

mais efetivo uma vez que a excisão cirúrgica da melanomatose dérmica e de formações que envolvam uma grande extensão de invasão tecidual não é viável (VALENTINE, 1995.; MacGILLIVRAY; SWEENEY; DEL PIERO, 2002).

A cimetidina, um antagonista de receptor H₂ de histamina, tem sido utilizada como tratamento do melanoma equino devido a propriedades imunomodulatórias e antitumorais (LAUS et al., 2010). Há evidências de que a histamina possui um papel modulador na regulação da imunidade tumoral devido a um padrão de expressão anormal de citocinas via receptores H₂ (KUBECOVA et al., 2011). A cimetidina age bloqueando o estímulo que a histamina exerce sobre células T-supressoras para sua ativação (KNOTTENBELT, 2009). Estudos em humanos e camundongos demonstram que o acúmulo de células supressoras (Tregs) no tecido tumoral e linfonodo de pacientes oncológicos estão correlacionados com a progressão tumoral e um pior prognóstico (GABRILOVICH; OSTRAND-ROSENBERG, BRONTE, 2012). Outros mecanismos de ação foram demonstrados na sua utilização em certas neoplasias humanas, porém, na Medicina Veterinária, ainda existe a necessidade de mais estudos comparativos para avaliar a efetividade da cimetidina em diferentes tipos de melanomas assim como seus diferentes mecanismos de ação (LAUS et al., 2010; KUBECOVA et al., 2011).

Existem relatos de tratamentos bem-sucedidos, onde o fármaco foi capaz de causar uma redução de até 90% no tamanho e quantidade de massas tumorais em dois de três equinos avaliados (GOETZ et al., 1990), porém outros trabalhos não conseguiram obter os mesmos resultados positivos (FINTL; DIXON, 2001; LAUS et al., 2010). A dosagem de cimetidina para o tratamento de melanoma equino na literatura varia desde 1,6 mg/kg SID a 7,5 mg/kg BID por via oral (GOETZ et al., 1990; LAUS et al., 2010). Segundo Robinson e Sprayberry (2009), o tratamento para redução de tumores tem duração de 2 meses e a dosagem recomendada é de 2,5 a 4,0 mg/kg TID por via oral. Na prática, é observado que alguns animais não respondem às doses baixas indicadas na literatura, porém apresentam boa resposta quando utilizadas as doses recomendadas para o tratamento de úlcera gástrica.

A falta de estudos que proporcionem similaridade em protocolos de administração, metodologia, apresentação clínica e dosagem impossibilita uma comparação para comprovação da eficácia da cimetidina como método de tratamento em melanoma equino (LAUS et al., 2010). A padronização das técnicas, assim como

mais estudos sobre os mecanismos de ação da droga e de sua função antitumoral se fazem necessários para comparar e avaliar a efetividade deste fármaco como forma de tratamento de melanoma em equinos de pelagem tordilha.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os tumores melanocíticos em equinos são uma afecção reconhecida há centenas de anos e a causa de seu desenvolvimento ainda não é completamente conhecida (VALENTINE, 1995; FLEURY et al., 2000b; PHILLIPS, LEMBCKE, 2013). Podem ser facilmente reconhecidos devido à sua pigmentação escura característica, porém os tumores podem por vezes apresentar áreas despigmentadas (PHILLIPS, LEMBCKE, 2013). Diversos estudos foram descritos sugerindo diferentes formas terapêuticas, porém não existe até o momento um tratamento eficiente para estágios avançados de melanoma em equinos (MOORE et al., 2013). Em humanos, as estratégias de tratamento utilizadas não têm causado um impacto significativo em sobrevida ou mortalidade de pacientes, ressaltando-se ainda mais a necessidade de investigação dos mecanismos moleculares da gênese tumoral do melanoma (ÜNAL et al., 2015).

O tamanho das formações é bastante relevante já que está associada ao aparecimento de manifestações clínicas e ao prognóstico (VALENTINE, 1995). Os tumores podem variar de 0,2 a 20 cm de diâmetro e, dependendo de sua localização, podem causar uma série de manifestações clínicas (KNOTTENBELT, 2009; MOORE et al., 2013). No caso dos melanomas localizados na região perineal e ventral de cauda, o animal pode apresentar dificuldades para defecar, cólicas, diarreia, caquexia e infecções secundárias das lesões ulceradas, além de efeitos de compressão causados por possível metástase (MOORE et al., 2013; PHILLIPS, LEMBCKE, 2013).

O mercado australiano de carne equina também é afetado devido a áreas de metástase que podem estar presentes nas carcaças dos animais. Na Austrália (SUTTON; COLEMAN, 1997), por exemplo, a exportação deste tipo de carne para consumo humano é um negócio pequeno, porém significativo. Animais de pelagem tordilha não são aceitos para este propósito devido ao alto risco das carcaças possuírem lesões viscerais bastante pigmentadas, muitas envolvendo a musculatura esquelética, o que desvaloriza e inutiliza a carne. A regulamentação do país declara que as carcaças afetadas devem ser descartadas. Os abatedouros adquirem os animais em lotes e a presença de animais de pelagem tordilha desvaloriza os lotes e causa perdas econômicas às empresas (SUTTON; COLEMAN, 1997). A habilidade

de prever e extensão da doença *ante-mortem* auxiliaria a minimizar estas perdas econômicas.

Os nódulos se originam da transformação de melanócitos “normais” e da alteração do metabolismo da melanina como causa inicial (LAUS et al., 2010; PHILLIPS; LEMBCKE, 2013). Estudos recentes sugerem que o desenvolvimento destas formações se deve a mutações genéticas que alteram o metabolismo molecular da melanina através do aumento da atividade dos melanócitos, criando assim uma produção exacerbada de melanina e transformando estes melanoblastos hiperplasiados em células tumorais (PHILLIPS; LEMBCKE, 2013).

Outros autores investigaram um possível componente hereditário no desenvolvimento de melanomas. Seltenhammer et al. (2003) conduziram um estudo com 296 equinos da raça Lipizzaner, onde 50% dos animais utilizados apresentavam melanomas. Esta raça é o resultado de 400 anos de “inbreeding”, demonstrando assim que o fator genético poderia contribuir para uma incidência maior de melanoma, sugerindo existir uma predisposição hereditária. Um resultado semelhante foi obtido nos animais da raça Camargue, que apresenta maior heterogenicidade, onde a incidência da doença foi de 31,4% (FLEURY et al., 2000a). Em ambos estudos, a maioria dos tumores localizavam-se em base de cauda, região perineal e perianal.

Teixeira et al. (2013) obtiveram resultados que demonstraram que a severidade e a incidência de melanomas em uma população de mais de 300 cavalos tordilhos da raça Quarto de Milha era de 16%, ou seja, menor do que as encontradas nas demais raças já estudadas. Este resultado poderia ser explicado devido à ausência de interesse na pelagem tordilha nesta raça.

A hipótese de que uma mutação genética responsável pela gradual despigmentação folicular também seria responsável pela formação de melanomas em equinos tordilhos foi proposta por Pielberg et al. (2008) e tem sido pesquisada desde então. As duas alterações estariam associadas a uma duplicação de 4.6kb do intron 6 do gene *syntaxin-17* (STX17) e do gene vizinho Membro 3 do Grupo A da Subfamília 4 de Receptores Nucleares (NR4A3). A duplicação (Figura 1) foi detectada em todos os fenótipos tordilhos em mais de oitocentos animais de 14 raças diferentes (PIELBERG et al., 2008). Os autores sugerem que a alteração de regulação do STX17 e do NR4A3 leva a uma proliferação dos melanócitos do folículo piloso causando uma

depleção gradual de células tronco progenitoras e perda de pigmentação com o avanço da idade. Ao mesmo tempo, a perda de controle de um ou ambos os genes levam à proliferação dos melanócitos da derme na pele desprovida de pelos causando uma hiperpigmentação,¹ predispondo assim o cavalo tordilho ao desenvolvimento de melanomas. As células tronco dos melanócitos presentes no folículo do pelo sofrem diferenciação e morrem durante o processo de pigmentação enquanto que os melanócitos presentes na derme sobrevivem ao ciclo folicular. Esta descoberta fornece evidências de que há uma compartimentalização bem definida entre as subpopulações de melanócitos da derme e do folículo piloso (PIELBERG et al., 2008). A investigação de Pielberg et al. (2008) trouxe novas perspectivas dos possíveis papéis destes genes nas características de pigmentação tanto do pelo quanto da pele e no desenvolvimento de tumores cutâneos.

Figura 1 - Caracterização molecular do locus da mutação causadora de despigmentação em equinos

Fonte: PIELBERG et al., 2008

Observa-se a expansão do número de cópias da duplicação do STX17 em tumores mais agressivos, sugerindo assim que a mesma está relacionada a um elemento amplificador de melanoma (SUNDSTRÖM et al., 2012). Em um estudo conduzido por Seltenhammer et al. (2014) envolvendo um modelo *in vitro* de duas linhagens de células representando um estágio primário e um estágio metastático de melanoma de equinos tordilhos, demonstrou-se que as células do estágio metastático possuíam de cinco a oito cópias da sequência duplicada de STX17, enquanto que a primeira linhagem possuía apenas três cópias. Estas mesmas células possuíam um maior potencial oncogênico caracterizado por maior taxa de crescimento, alta

capacidade de invasão e adesão e maior tamanho de tumor (SELTENHAMMER et al., 2014).

Devido à dificuldade de diagnosticar o grau de malignidade em proliferações melanocíticas de equinos, a pesquisa por um marcador molecular de malignidade tornou-se extremamente importante (SELTENHAMMER, et al.; 2004). O RACK 1 (Receptor for activated C kinase 1), uma proteína que funciona como ponto de ancoragem para a proteína C quinase, tem um papel vital na sinalização celular e foi associada com a transformação em tumores melanocíticos (CAMPAGNE et al., 2012). Estudos sugerem que o nível de expressão de RACK1 pode ser utilizado como marcador na diferenciação entre tumores melanocíticos benignos e malignos (CAMPAGNE et al., 2012). Este biomarcador foi detectado, através de imunofluorescência, nas células de melanoma em tumores primários de suínos e pacientes humanos, porém não foi encontrado em melanócitos normais cutâneos ou em proliferações tumorais benignas (EGIDY et al., 2008). O estudo conduzido por Campagne et al. (2012) demonstrou que a distribuição celular de RACK1 reflete a progressão e agressividade do melanoma: quanto mais homogênea e difusa é a distribuição citoplasmática do marcador, mais agressivo é o melanoma. Os resultados também comprovam que o padrão de distribuição celular de RACK1, homogêneo em tumores malignos e heterogêneo em tumores benignos, permanece constante por toda a extensão da lesão.

O Fator de Diferenciação de Crescimento 15 (GDF-15), um membro da superfamília dos Fatores de Crescimento Transformadores Beta (TGF- β), foi alvo de estudo de Boyle et al. (2009), onde a análise de 53 linhagens celulares de melanoma por imuno-histoquímica demonstrou a presença de baixa expressão de GDF-15 em melanomas primários enquanto que todos os melanomas metastáticos apresentaram alta expressão de GDF-15. Os resultados confirmaram uma diferença significativa na expressão da proteína entre amostras de melanoma maligno de linfonodos acometidos por metástase e linfonodos normais ou que possuíam nevos benignos (BOYLE et al., 2009). Consistentemente, em resultados de vários estudos recentes, o GDF-15 encontrou-se sobre-expressado em células de melanoma e foi associado à invasão e metástase tumoral, através da redução de adesão celular e angiogênese com a indução da proteína HIF-1 α e seus genes alvo (ÜNAL et al., 2015).

De maneira geral, melanomas em animais tordilhos não são invasivos e aumentam seu tamanho muito lentamente ou demonstram “dormência” por longos períodos (McFADYEAN, 1933; SELTENHAMMER et al., 2003). Na maioria dos casos, os tumores apresentam-se encapsulados e nunca metastatizam, embora, em certas ocasiões, estas formações possam metastatizar tardiamente, tornando-se letais (SELTENHAMMER et al., 2003). A verdadeira incidência de melanoma metastático ainda é desconhecida já que na grande maioria dos casos as amostras não são submetidas a exame histológico (MacGILLIVRAY; SWEENEY; DEL PIERO, 2002). Metástase pode dar-se tanto pela via hematógena como pela via linfática e o envolvimento de diversos órgãos pode causar manifestações clínicas variadas e inespecíficas no paciente.

Um estudo conduzido por MacGillivray, Sweeney e Del Piero (2002) demonstrou que, em uma população de 101 animais diagnosticados com melanoma no período de 1990 a 2001, a taxa de metástase nestes pacientes foi de aproximadamente 14%. Destes 14 cavalos tordilhos acometidos por metástase, 86% tinham mais de 14 anos (MacGILLIVRAY; SWEENEY; DEL PIERO, 2002). Metástase foi a causa da morte de 12 dos 14 animais e estes cavalos apresentavam comprometimento, principalmente de linfonodos, tanto regionais quanto satélites, vasos sanguíneos, pulmões, baço, fígado, mesentério, superfície serosa intestinal, abdômen, mediastino, músculo esquelético, glândula parótida, medula óssea e vértebras (MacGILLIVRAY; SWEENEY; DEL PIERO, 2002). Os locais menos frequentes de disseminação do tumor foram glândulas adrenais, rim, diafragma, coração, bolsas guturais e glândula mamária (MacGILLIVRAY; SWEENEY; DEL PIERO, 2002).

Em um artigo de revisão, Fintl e Dixon (2001) descreveram cinco casos de melanoma em região de glândula parótida em equinos tordilhos e, ao exame de necropsia, comprovou-se metástase em dois dos animais acometidos com disseminação do tumor em linfonodos retrofaríngeos, submandibulares e pré-escapulares, veia jugular, bolsas guturais, pulmões, baço e fígado. Outro relato de animal tordilho de quinze anos de idade com histórico de perda de peso progressiva, depressão, anorexia, pirexia e edema em região de tórax apresentou, ao exame *post-mortem*, metástase em vários órgãos, dentre eles o mediastino, medula espinhal em

região de vértebra T13, bolsa gutural, meninges, tecido pulmonar, pleura e esôfago (METCALFE et al., 2013).

Segundo Valentine (1995), o exame histopatológico não é suficiente para prever o potencial metastático dos tumores e se faz necessário estabelecer um sistema de marcadores confiáveis para esta finalidade. Em seu estudo retrospectivo, a autora descreve a classificação de ao menos quatro formas distintas de tumores melanocíticos em equinos: nevo melanocítico, melanoma dérmico, melanomatose dérmica e melanoma anaplásico maligno. Cada tipo possui características clínicas, histológicas e comportamentais específicas. Em algumas circunstâncias, os tumores melanocíticos são difíceis de classificar, como é o caso do melanoma dérmico e a melanomatose dérmica, que são geralmente indistinguíveis histologicamente (VALETINE, 1995). Já em uma investigação conduzida por Fleury et al. (2000a), os tumores foram divididos, baseando-se em suas características histológicas, em melanomatose, descritos como nódulos muito pigmentados, presença de atipia celular ambígua, reduzido número de figuras mitóticas e localização dérmica, e o anaplásico, de incidência baixa, mau prognóstico, mitose frequente, notável atipia celular e localização epidérmica.

A cimetidina, o mais antigo dos antagonistas de receptor tipo 2 da histamina (H_2) clinicamente utilizados, é empregado principalmente no tratamento de úlceras gástricas e duodenais, refluxo gastroesofágico e profilaticamente em condições que possam aumentar consideravelmente a acidez gástrica (KUBECOVA, 2011). Em humanos, é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal, sofre metabolismo hepático e é cerca de 70% biodisponível após administração oral (ADAMS, 2003). Segundo um estudo conduzido por Smyth et al. (1990), a biodisponibilidade da cimetidina administrada por via oral em equinos é diferente da observada em humanos. Em cavalos, este valor está em torno de 12,3% a 47,2%. Estes baixos valores de biodisponibilidade devem-se, provavelmente, a absorção incompleta ou degradação da cimetidina no trato gastrointestinal da espécie (SAMS et al., 1997). Apesar deste fato, o fármaco se mostra um efetivo inibidor de secreção de ácido gástrico, indicando assim que os receptores gástricos de H_2 nos cavalos são muito mais sensíveis ao antagonista do que na espécie humana ou que os sítios de ligação dos receptores interajam de forma distinta com seu antagonista (SMYTH et al., 1990).

A meia-vida plasmática da cimetidina em humanos é de cerca de uma a duas horas, mas pode ser prolongada na presença de hepatopatia, alimento ou nefropatia. Em equinos, este valor está em torno de $2.23 \pm 0,64$ horas, indicando que a droga é amplamente distribuída e rapidamente removida nesta espécie (SMYTH et al., 1990). A excreção se dá através da urina, com 60% do fármaco inalterado, por filtração glomerular e secreção tubular. O restante é biotransformado em sulfóxido inativo (SAMS et al., 1997). Em equinos, a clearance renal varia entre 2.19 e 6.23 /min/kg e é de extrema importância, uma vez que representa 36.3% a 81.8% do clearance do plasma (SAMS et al., 1997).

As dosagens recomendadas por via oral de cimetidina para o tratamento de úlceras gástricas em equinos variam de 8,8 mg/kg a 48 mg/kg em dose única ou em doses divididas (SMYTH, 1990), onde a dose mais baixa foi estabelecida baseada em observações na supressão de secreção de ácido gástrico por um período de duas a oito horas pós-administração e a dose mais alta baseou-se em resultados de estudos farmacocinéticos e uma concentração plasmática alvo do fármaco de 1,0 µg/mL (SAMS et al., 1997). No experimento realizado por Sams et al. (1997), a concentração plasmática máxima alcançada após administração de cimetidina por via oral na dose de 4,0 mg/kg variou entre 0,24 a 0,5 µg/mL e foram observadas 90 a 180 minutos após a administração do fármaco. Já no estudo conduzido por Smyth et al. (1990) o pico de concentração plasmática alcançado foi de $1,81 \pm 0,82$ µg/mL e ocorreu aproximadamente 84 a 140 minutos após a administração da cimetidina na dose de 10 mg/kg por via oral em dose única. Observa-se, portanto, que a dose de administração da droga é um fator importante para conseguir alcançar um pico de concentração plasmática maior em pacientes equinos.

A administração de cimetidina por via oral na dose de 20 mg/kg BID em um total de sete administrações em cavalos atletas levou a um aumento na meia-vida sérica do fármaco (7.05 ± 1.02 horas) quando comparado aos demais estudos, porém esta diferença poderia ser atribuída à maior sensibilidade analítica do teste utilizado e nas diferenças no protocolo de amostragem (KNYCH et al., 2016).

Em humanos, quando a cimetidina é administrada em jejum, ocorre um segundo pico de concentração plasmática três horas após a administração (PANTZIARKA et al., 2014), porém este fato não foi observado nos estudos conduzidos em equinos.

Devido à sua suposta ação imunomoduladora, a cimetidina vem sendo vastamente analisada na literatura nos últimos anos como método de tratamento clínico para melanoma em equinos de pelagem tordilha e para uma grande variedade de neoplasias humanas. O fármaco estimula o sistema imune e exerce efeitos antitumorais através de diversos mecanismos, porém a sua efetividade clínica ainda permanece questionável (NATORI et al., 2005; PHILLIPS; LEMBCKE, 2013). Os resultados dos estudos em equinos variaram desde uma redução de até 90% do volume das formações em dois de três animais tratados (GOETZ et al., 1990) até nenhuma efetividade comprovada da droga (FINTL; DIXON, 2001; LAUS et al., 2010). É utilizada como uma imunoterapia inespecífica que tem como alvo indireto as células tumorais e antígenos tumorais relacionados pois age bloqueando os receptores H_2 de células do sistema imune (KUBECOVA et al., 2011; PHILLIPS; LEMBCKE, 2013).

O interesse pelo potencial antitumoral da cimetidina em humanos foi inicialmente relatado em um estudo conduzido por Burtin et al (1988) onde 27 de 31 pacientes que apresentavam estágios avançados de neoplasias foram tratados com a combinação de histamina e cimetidina e obtiveram uma melhora clínica. A suspensão da administração das substâncias induziu a uma recidiva em alguns pacientes, revertida após a repetição do protocolo de tratamento (BURTIN et al., 1988). Estudos subsequentes, que focaram especialmente na ação imunomoduladora da cimetidina em animais, deram início a muitos estudos clínicos discutindo o papel desta droga na oncologia (PANTZIARKA et al., 2014).

A ativação dos receptores H_2 resulta em uma série de respostas fisiológicas, incluindo estímulo das células T supressoras (Treg), diminuição da quimiotaxia e ativação de neutrófilos e basófilos, proliferação de linfócitos e ativação de células *natural killer*. Estes receptores são potentes estimuladores da produção de AMP cíclico (AMPc) (SHAHID et al., 2009).

A histamina é um potente mediador de numerosas reações fisiológicas e pertence à classe das aminas biogênicas (FALUS; GILICZE, 2014). É sintetizada a partir do aminoácido histidina, sob ação da enzima L-histidina decarboxilase (HDC), a qual contém piridoxina (vitamina B6) (CRIADO et al., 2010). Uma grande variedade de tumores expressa HDC e os mesmos podem secretar grandes quantidades de histamina de forma autócrina ou parácrina (PANTZIARKA et al., 2014). Esta substância é altamente pleiotrópica e possui múltiplas funções que envolvem a

resposta imune inflamatória, secreção gástrica e atuação como neurotransmissor (PANTZIARKA et al., 2014). Em humanos, as células e tecidos do melanoma, mas não os melanócitos normais, expressam HDC e contém uma grande concentração de histamina (MEDINA; RIVERA, 2010). Estas apresentam receptores para a mesma, e a histamina, tanto endógena quanto exógena tem a habilidade de regular o crescimento das células de melanoma, o que sugere a existência de uma regulação autócrina e parácrina mediada por esta substância (HEGYESI et al., 2001; FALUS; GILICZE, 2014). Diversos estudos *in vivo* com modelos animais utilizando enxertos de melanoma demonstraram que tanto a histamina endógena quanto a exógena possuem a capacidade de estimular crescimento tumoral enquanto que os antagonistas dos receptores H₂ inibem este efeito (TOMITA; OKABE, 2005).

O melanoma possui a capacidade não só de produzir e secretar histamina no ambiente tumoral, como também o de detectar a presença da substância através da expressão dos receptores H₁R e H₂R. Notavelmente, a histamina consegue influenciar o sistema imune no microambiente tumoral muito eficientemente, podendo fazer o mesmo em nível de apresentação de antígeno em linfonodos de drenagem (FALUS; GILICZE, 2014). A histamina derivada do tumor deve ser incluída como um fator de extrema importância no processo que envolve a interação entre o tecido tumoral e as células do sistema imune infiltradas, pois sua presença pode agir como estimulante ou supressor de crescimento tumoral dependendo do equilíbrio de receptores de histamina local (FALUS et al., 2001).

Em um modelo tumoral experimental utilizando camundongos CT-26 Balb/c, a administração diária de cimetidina inibiu o aumento de volume e peso tumoral após o sexto dia de inoculação. A droga também reverteu a supressão da expressão de citocinas teciduais, como LT- α , TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-15. Neste caso, os efeitos da cimetidina no crescimento tumoral podem ter sido mediados pela restauração de expressão local de citocinas exercendo assim um efeito antitumoral (TAKAHASHI et al., 2001).

Os efeitos imunomoduladores pré-operatórios da cimetidina sobre os linfócitos T de sangue periférico (CD₃⁺), *natural killers* (CD₅₇⁺) e linfócitos T-helper (CD₄⁺) de pacientes que possuíam câncer no sistema gastrointestinal foram avaliados por Lin et.al (2004) em um ensaio clínico envolvendo 49 pacientes humanos. O tratamento iniciou-se sete dias antes do procedimento cirúrgico e foi mantido até dez dias pós cirurgia.

O exame histopatológico dos tumores removidos foi efetuado para analisar a presença de linfócitos tumorais infiltrados em sua margem (LIN et al., 2004). Os pacientes do grupo tratado com a cimetidina demonstraram resposta favorável nos parâmetros referentes à imunidade celular através de um lento, mas constante aumento nas concentrações de $CD3^+$ e $CD4^+$, comprovando assim sua efetividade como droga imunomoduladora nas células do sistema imune em sangue periférico, acelerando a recuperação celular. A administração do fármaco demonstrou estimular a resposta de linfócitos tumorais infiltrados no sítio do tumor, fator crucial para o controle e restrição de crescimento tumoral e regressão da agressividade da formação (LIN et al., 2004).

Além de sua atividade imunomoduladora, há evidências de que a cimetidina possui efeito antitumoral através de diferentes mecanismos, como interferência na adesão celular, angiogênese e proliferação de células tumorais (PANTZIARKA et al., 2014). A abundância de evidência clínica demonstra que a cimetidina possui efeitos terapêuticos em uma grande variedade de tipos de neoplasias, principalmente em tumores do trato gastrointestinal, melanoma e carcinoma de células renais. Também existem evidências *in vivo* e *in vitro* que estes resultados estão relacionados ao seu efeito imunomodulador. Porém, há indícios de que este efeito esteja além de sua ação direta sobre os receptores H_2 e que esta substância pode possuir efeitos diferentes dos previstos (off-target), não compartilhados por outros antagonistas de H_2 (PANTZIARKA et al., 2014).

Apesar dos bons resultados obtidos por Goetz et al. (1990) na utilização da cimetidina para tratar melanoma em três equinos tordilhos na dose de 2,5 mg/kg TID por via oral, estudos subsequentes não conseguiram proporcionar, na grande maioria dos casos, evidências convincentes dos benefícios do fármaco (KNOTTENBELT, 2009). Em certos experimentos, alguns animais pareceram responder, porém o efeito clínico é muitas vezes difícil de quantificar. O trabalho conduzido por McGillivray, Sweeney e Piero (2002) administrou cimetidina em cinco cavalos, na dose de 2,5 mg/kg TID por via oral, onde três deles receberam a vacina autóloga associada ao tratamento com a droga. Tanto os veterinários responsáveis quanto os proprietários dos pacientes relataram sucesso parcial com relação ao retardo de crescimento tumoral, porém esta afirmação foi feita baseada unicamente em uma avaliação subjetiva. O fato do autor empregar uma combinação de protocolos de tratamento dificultou a avaliação da eficácia do tratamento com cimetidina.

Anos mais tarde, Laus et al. (2010) testaram a droga em 10 animais utilizando duas doses variadas de cimetidina por um período de 60 dias e observaram uma diminuição de volume das formações, mas não na redução do número de formações, das regiões ventral de cauda e perianal de um animal. O primeiro grupo recebeu o fármaco na dose de 3,5 mg/kg BID por via oral e no segundo grupo foi administrada na dose de 7,5 mg/kg SID por via oral. Este efeito foi documentado após a primeira semana de tratamento, seguido por um aumento e estabilização do tamanho das formações em valores menores dos que apresentados na primeira avaliação. Na literatura indica-se que, caso a droga venha a apresentar resultados favoráveis, estes surgirão durante as primeiras seis semanas de tratamento e a administração da cimetidina deve ser mantida diariamente até que não se observem mais sinais de melhora (KNOTTENBELT, 2009).

3 OBJETIVOS

- Avaliar a eficácia da utilização da cimetidina como única forma de tratamento para reduzir o tamanho de melanomas localizados em região ventral de cauda e períneo.
- Determinar a eficácia da cimetidina no controle do surgimento de novas formações nas mesmas regiões.
- Avaliar a duração do efeito do tratamento com a cimetidina após sua suspensão em relação à manutenção da redução de tamanho e do aparecimento de novas formações.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Para o desenvolvimento do projeto foram selecionados trinta e dois equinos tordilhos com idade entre sete e 30 anos, sem restrição de raça e sexo, que apresentavam melanomas em região ventral de cauda e períneo, com até 5,0 cm de diâmetro e sem histórico anterior de tratamento com cimetidina ou procedimento cirúrgico para esta finalidade. Os animais recrutados pertenciam à Cavalaria de São Paulo e à Fazenda do Instituto Butantã. Os equinos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: o grupo tratamento contendo 21 animais, sendo 13 da Fazenda do Butantã, oito da Cavalaria de São Paulo; e o grupo controle, contendo 11 animais, sendo seis pertencentes à Fazenda do Instituto Butantã e cinco pertencentes à Cavalaria de São Paulo. Todos os animais da Fazenda do Butantã foram afastados de serviço, porém os animais da Cavalaria de São Paulo permaneceram em suas atividades rotineiras até o final do projeto (Figura 2).

As formações dos dois grupos de equinos foram avaliadas e mensuradas quinzenalmente durante o decorrer do tratamento e mensalmente após o término da administração da droga. O grupo tratamento recebeu 18 mg/kg de cimetidina por via oral, BID durante noventa dias. Os animais do grupo controle não receberam nenhum tipo de placebo. Os cavalos foram avaliados de fevereiro a novembro de 2016 na Fazenda do Butantã e de março a dezembro de 2016 na Cavalaria de São Paulo, totalizando 240 dias de monitoramento.

Figura 2 – Animal selecionado da Cavalaria de São Paulo (A) e animais da Fazenda do Butantã (B)

Fonte: (CIVITA, M., 2016)

4.2 PROCEDIMENTOS DE MENSURAÇÃO E COLETA

Os cavalos foram inicialmente avaliados com exame físico, hemograma, pesagem (utilizando uma fita de peso na Cavalaria e uma balança na Fazenda do Butantã) e mensuração de todas as formações com um paquímetro digital (Figura 3). As formações também foram descritas com relação a sua localização e características (único, múltiplo, ulcerado, não ulcerado). Estas foram fotografadas em todas as visitas para registro, monitoramento e exata localização.

Figura 3 – Mensuração das formações com paquímetro digital

Fonte: (CIVITA, M., 2016)

As visitas às propriedades foram feitas quinzenalmente durante a duração do tratamento e mensalmente após o término de administração da cimetidina (ou após o mesmo período no grupo Controle) por um período de 150 dias. Previamente à mensuração, era efetuada a tricotomia, lavagem da base de cauda e períneo com água e detergente líquido para remoção de pelos e fezes. Após secagem com papel toalha, a mensuração era efetuada com paquímetro digital (DEXTER Digital Caliper three button within 300 mm). Em seguida à mensuração, os melanomas eram pintados com corretor líquido e mapeados através de registros fotográficos (Figura 4). Para cada formação foi feita a estimativa do seu volume baseado no produto das três dimensões mensuradas (comprimento, largura e espessura).

Figura 4 – Imagens das formações antes (A) e depois de mapeados (B).

Fonte: (CIVITA, M., 2016)

4.3 PESAGEM E ADMINISTRAÇÃO DA CIMETIDINA

A pesagem da cimetidina (VET FÓRMULA – Farmácia de Manipulação Veterinária) deu-se de acordo com o peso obtido de cada animal e do cálculo do mesmo com a dose estipulada pelo estudo. Foi utilizada uma balança de precisão (POCKET SCALE MH-500 – 500g/0.1g) e a droga foi separada em embalagem plástica com envelope adesivo para um total de 30 dias de administração por cavalo, ou seja, 60 embalagens individuais por animal. Este procedimento repetiu-se por três vezes até o término do tratamento. A cimetidina foi diluída em 50 mL de água e administrada por via oral, duas vezes ao dia, durante um período de 90 dias (Figura 5). Devido ao seu forte sabor amargo, alguns animais não aceitaram bem a administração do fármaco diretamente na boca e adotou-se então a mistura do mesmo à ração da manhã e da tarde. Este procedimento foi utilizado pela Cavalaria de São Paulo para facilitar manejo e forma de administração, além de melhorar a aceitação da cimetidina pelos pacientes.

Figura 5 – Administração da cimetidina por via oral

Fonte: (CIVITA, M., 2016)

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O presente experimento utilizou o Teste de Hipóteses na análise estatística para avaliar se houve diferença significativa entre o volume total (pela porcentagem de aumento ou diminuição) dos melanomas do Grupo Tratamento e do Grupo Controle em três momentos distintos: início do experimento (D0) versus final do tratamento (D90), final de tratamento (D90) versus final do experimento (D240) e início do experimento (D0) versus final do experimento (D240). Também foram calculados o volume total e a média do volume de tumores de cada animal individualmente antes do início do tratamento (D0), final do tratamento (D90) e final do experimento (D240). Efetuou-se a compilação de nódulos novos e de nódulos que desapareceram ao longo do período do experimento como análise suplementar da efetividade do tratamento. Por último, acompanhou-se a soma dos volumes dos tumores de todos os animais ao início e ao final do experimento de forma a avaliar, globalmente, a efetividade do tratamento com cimetidina.

Os animais dos dois grupos foram separados por idade para analisar se esta variável teria alguma influência na efetividade da resposta ao tratamento com cimetidina. A divisão foi feita da seguinte forma: classificaram-se de “jovens” os equinos com até 14 anos de idade e de “idosos” os que tinham quinze anos ou mais. Investigação semelhante foi feita para analisar a influência do manejo na resposta ao tratamento e neste caso, os animais foram classificados por estabelecimento (Instituto Butantã e Cavalaria de São Paulo). Considerou-se o valor de $p \leq 0,05$ como indicativo de significância estatística.

A partir da análise da evolução do volume total dos melanomas nos três instantes previamente apresentados, foram construídos intervalos com 95% de confiança para a média das seguintes variáveis: variação do volume total dos tumores por cavalo, variação da média do volume das neoplasias por animal e diferença de resposta dos animais de acordo com seu respectivo grupo (Controle versus Tratamento). Uma vez obtidos os intervalos de confiança, foram efetuados testes de hipóteses para avaliar se as variáveis em questão apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os animais dos grupos Tratamento e Controle.

Com os dados apresentados, foram realizados os seguintes testes de hipóteses, cujos parâmetros foram calculados com o auxílio do software GraphPad Instat™ (GraphPad Software, versão 3.10) baseados nos testes T de Welch e T de Student:

- 1) Comparação da média da variação do volume tumoral entre grupos Tratamento e Controle.

$$H_0: \mu_{\text{TRATAMENTO}} = \mu_{\text{CONTROLE}}$$

$$H_A: \mu_{\text{TRATAMENTO}} \neq \mu_{\text{CONTROLE}}$$

- 2) Verificação da influência da idade na média da variação do volume tumoral entre os animais do Grupo Tratamento.

$$H_0: \mu_{\text{JOVENS}} = \mu_{\text{IDOSOS}}$$

$$H_A: \mu_{\text{JOVENS}} \neq \mu_{\text{IDOSOS}}$$

- 3) Verificação da influência do manejo na média da variação do volume tumoral entre os animais do Grupo Tratamento.

$$H_0: \mu_{\text{CAVALARIA}} = \mu_{\text{BUTANTÃ}}$$

$$H_A: \mu_{\text{CAVALARIA}} \neq \mu_{\text{BUTANTÃ}}$$

5. RESULTADOS

Ao exame físico, todos os animais encontravam-se saudáveis nas duas propriedades designadas e nenhuma alteração hematológica foi encontrada no início do experimento nos 32 pacientes selecionados.

Por meio da realização dos testes de hipóteses descritos na Análise Estatística, foram calculados os valores-p associados a cada cenário para comparar o comportamento dos grupos Controle e Tratamento, Jovens e Idosos, manejo Butantã e Cavalaria. O resultado leva em consideração os seguintes parâmetros: variação média do volume das formações, variação da soma do volume de formações por cavalo e variação da média do volume de formações por cavalo. Para cada uma das variáveis supracitadas, foi realizado um teste de hipóteses nos seguintes moldes para a comparação das médias entre os grupos:

$$H_0: \mu_{\text{TRATAMENTO}} = \mu_{\text{CONTROLE}}$$

$$H_A: \mu_{\text{TRATAMENTO}} \neq \mu_{\text{CONTROLE}}$$

Os resultados da comparação entre os grupos Tratamento e Controle encontram-se na Tabela 1 e nos Gráficos 1 e 2. A comparação entre os cavalos jovens e cavalos idosos encontra-se na Tabela 2. O estudo da influência do manejo (comparação entre cavalos do Butantã e da Cavalaria) nas médias dos parâmetros encontra-se na Tabela 3.

Também foram calculados os intervalos com 95% de confiança para a média da variação dos parâmetros de referência tanto para o grupo Tratamento quanto para o grupo Controle. Foi possível, ainda, realizar a estimativa dessas variáveis para um animal isolado (hipotético) a partir das amostras efetivamente coletadas. A Tabela 4 apresenta os intervalos de confiança obtidos para o grupo Tratamento, enquanto a Tabela 5 apresenta os resultados relativos ao grupo Controle.

Ainda foi realizada a compilação das formações que surgiram ao longo do tratamento em todos os cavalos, chamados no presente trabalho de “novos”. A Tabela 6 apresenta a compilação de tais formações para o Grupo Controle, enquanto a Tabela 7 enumera as formações novas do Grupo Tratamento. Nas tabelas, nódulos

ainda inexistentes são descritos pelo volume “0”, enquanto nódulos não mensuráveis são descritos pela sigla “NM”.

Além disso, foi realizado o levantamento dos melanomas desaparecidos ao longo do período do experimento. A Tabela 8 apresenta os nódulos desaparecidos por propriedade (Butantã e Cavalaria). A Tabela 9 apresenta o volume total das formações dos grupos Controle e Cavalaria no início e ao final do experimento. O Gráfico 3 mostra tais parâmetros na forma de ilustração.

Por último, verificou-se o comportamento da soma dos volumes de formações para cada cavalo tomado isoladamente. As Tabelas 10 e 11 apresentam a evolução de tais parâmetros para o Grupo Tratamento, enquanto as Tabelas 12 e 13 mostram os mesmos dados obtidos para o Grupo Controle.

Tabela 1 – Comparação das médias entre os grupos Tratamento e Controle

Parâmetro	Período	TRATAMENTO			CONTROLE			Valor-p	Hipótese Nula
		Média	Desv Pad	Tam Amostra	Média	Desv Pad	Tam Amostra		
Formações isoladas	D90 contra D0	-3,64%	7,37%	135	1,06%	3,49%	94	<0,01%	Rejeitada
Formações isoladas	D240 contra D90	2,96%	4,76%	135	0,16%	2,97%	94	<0,01%	Rejeitada
Formações isoladas	D240 contra D0	-0,96%	6,63%	135	1,15%	2,42%	94	0,09%	Rejeitada
Soma volume por cavalo	D90 contra D0	-3,70%	6,88%	20	1,95%	2,39%	11	0,27%	Rejeitada
Soma volume por cavalo	D240 contra D90	4,42%	4,27%	20	0,14%	2,27%	11	0,11%	Rejeitada
Soma volume por cavalo	D240 contra D0	0,56%	7,56%	20	2,06%	1,44%	11	40,14%	Mantida
Média volume por cavalo	D90 contra D0	-3,81%	6,80%	20	1,77%	2,48%	11	0,29%	Rejeitada
Média volume por cavalo	D240 contra D90	2,07%	1,87%	20	-0,09%	1,63%	11	0,32%	Rejeitada
Média volume por cavalo	D240 contra D0	-1,85%	5,97%	20	1,33%	1,37%	11	3,29%	Rejeitada

Gráfico 1 – Evolução da variação média do volume das formações tomados isoladamente (Grupos Tratamento e Controle)

Gráfico 2 – Evolução da variação média da soma do volume das formações por cavalo (Grupos Tratamento e Controle)

Tabela 2 – Comparação das médias entre os cavalos Jovens e cavalos Idosos

Parâmetro	Período	JOVENS			IDOSOS			Valor-p	Hipótese Nula
		Média	Desv Pad	Tam Amostra	Média	Desv Pad	Tam Amostra		
Formações isoladas	D90 contra D0	-5,97%	7,85%	61	-1,73%	6,40%	74	0,07%	Rejeitada
Formações isoladas	D240 contra D90	3,29%	5,75%	61	2,69%	3,78%	74	49,13%	Mantida
Formações isoladas	D240 contra D0	-3,14%	6,44%	61	0,84%	6,28%	74	0,04%	Rejeitada
Soma volume por cavalo	D90 contra D0	-6,73%	7,35%	9	-1,22%	5,63%	11	7,36%	Mantida
Soma volume por cavalo	D240 contra D90	4,20%	4,63%	9	4,41%	4,01%	11	91,51%	Mantida
Soma volume por cavalo	D240 contra D0	-2,82%	8,94%	9	3,02%	4,81%	11	10,61%	Mantida
Média volume por cavalo	D90 contra D0	-6,76%	7,36%	9	-1,40%	5,51%	11	7,87%	Mantida
Média volume por cavalo	D240 contra D90	2,37%	2,52%	9	1,84%	1,03%	11	53,22%	Mantida
Média volume por cavalo	D240 contra D0	-4,68%	5,85%	9	0,38%	4,92%	11	4,98%	Rejeitada

Tabela 3 – Comparação das médias entre os cavalos da Cavalaria e do Butantã - Grupo Tratamento

Parâmetro	Período	BUTANTÃ			CAVALARIA			Valor-p	Hipótese Nula
		Média	Desv Pad	Tam Amostra	Média	Desv Pad	Tam Amostra		
Formações isoladas	D90 contra D0	-3,08%	8,02%	12	-4,39%	6,40%	8	30,96%	Mantida
Formações isoladas	D240 contra D90	3,69%	5,66%	12	2,00%	2,98%	8	4,10%	Rejeitada
Formações isoladas	D240 contra D0	0,25%	7,01%	12	-2,56%	5,77%	8	1,43%	Rejeitada
Soma volume por cavalo	D90 contra D0	-3,57%	7,77%	12	-3,44%	5,80%	8	96,88%	Mantida
Soma volume por cavalo	D240 contra D90	5,47%	4,80%	12	1,91%	0,65%	8	2,76%	Rejeitada
Soma volume por cavalo	D240 contra D0	1,73%	8,33%	12	-1,61%	5,63%	8	33,53%	Mantida
Média volume por cavalo	D90 contra D0	-4,03%	7,63%	12	-3,47%	5,82%	8	86,27%	Mantida
Média volume por cavalo	D240 contra D90	2,21%	2,33%	12	1,89%	0,64%	8	71,34%	Mantida
Média volume por cavalo	D240 contra D0	-2,05%	6,16%	12	-1,66%	5,66%	8	88,83%	Mantida

Tabela 4 – Intervalos de confiança das médias dos parâmetros e predição para um cavalo isolado – Grupo Tratamento

Parâmetro	Período	ESTIMATIVA DA MÉDIA (95%)		TAMANHO DA AMOSTRA	ESTIMATIVA PARA UM CAVALO ISOLADO (95%)	
		Inferior	Superior		Inferior	Superior
Formações isoladas	D90 contra D0	-4,89%	-2,40%	135	-18,15%	10,86%
Formações isoladas	D240 contra D90	2,16%	3,77%	135	-6,40%	12,33%
Formações isoladas	D240 contra D0	-2,08%	0,16%	135	-14,01%	12,09%
Soma volume por cavalo	D90 contra D0	-6,71%	-0,68%	20	-18,46%	11,07%
Soma volume por cavalo	D240 contra D90	2,55%	6,30%	20	-4,74%	13,59%
Soma volume por cavalo	D240 contra D0	-2,75%	3,87%	20	-15,64%	16,77%
Média volume por cavalo	D90 contra D0	-6,79%	-0,83%	20	-18,28%	10,89%
Média volume por cavalo	D240 contra D90	1,25%	2,89%	20	0,42%	8,43%
Média volume por cavalo	D240 contra D0	-4,46%	0,77%	20	-12,24%	13,36%

Tabela 5 – Intervalos de confiança das médias dos parâmetros e predição para um cavalo isolado – Grupo Controle

Parâmetro	Período	ESTIMATIVA DA MÉDIA (95%)		TAMANHO DA AMOSTRA	ESTIMATIVA PARA UM CAVALO ISOLADO (95%)	
		Inferior	Superior		Inferior	Superior
Formações isoladas	D90 contra D0	0,36%	1,77%	94	-5,82%	7,94%
Formações isoladas	D240 contra D90	-0,44%	0,76%	94	-5,70%	6,01%
Formações isoladas	D240 contra D0	0,66%	1,64%	94	-3,62%	5,91%
Soma volume por cavalo	D90 contra D0	0,54%	3,37%	11	-3,55%	7,45%
Soma volume por cavalo	D240 contra D90	-1,20%	1,48%	11	-5,08%	5,36%
Soma volume por cavalo	D240 contra D0	1,21%	2,91%	11	-1,25%	5,36%
Média volume por cavalo	D90 contra D0	0,30%	3,24%	11	-3,94%	7,48%
Média volume por cavalo	D240 contra D90	-1,05%	0,88%	11	-3,84%	3,66%
Média volume por cavalo	D240 contra D0	0,52%	2,14%	11	-1,82%	4,49%

Tabela 6 – Compilação das novas formações – Grupo Controle

GRUPO DE ORIGEM	LOCAL DE ORIGEM	CAVALO	NÓDULO	VOLUME (cm ³)											
				D0	D15	D30	D45	D60	D75	D90	D120	D150	D180	D210	D240
CONTROLE	CAVALARIA	35	18	0	0	0	0	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,011	0,011	0,010
			19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,006
		776	13	0	0	0,023	0,026	0,026	0,023	0,025	0,025	0,026	0,028	0,026	0,026
			14	0	0	0	0	0,021	0,021	0,021	0,020	0,022	0,019	0,020	0,022
			15	0	0	0	0	0	0	0	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005
			16	0	0	0	0	0	0	0	0	0,017	0,016	0,016	0,017
			17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,025	0,024	0,025
			18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,031	0,032	0,030
		1128	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0,009	0,009	0,010	0,010
			17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,052	0,049	0,050
			18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,025
			19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,010
		1137	16	0	0	0,033	0,032	0,036	0,040	0,038	0,035	0,035	0,035	0,036	0,036
			17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,012	0,014	0,014
	BUTANTÃ	639	11	0	0	0	0	0	0	0	0,013	0,013	0,012	0,012	0,012
			12	0	0	0	0	0	0	0	0	0,025	0,024	0,024	0,023
			13	0	0	0	0	0	0	0	0	0,008	0,008	0,007	0,007
		761	11	0	0	0	0	0	0,016	0,016	0,017	0,017	0,016	0,017	0,017

Tabela 7 – Compilação das novas formações – Grupo Tratamento

GRUPO DE ORIGEM	LOCAL DE ORIGEM	CAVALO	NÓDULO	VOLUME (cm ³)											
				D0	D15	D30	D45	D60	D75	D90	D120	D150	D180	D210	D240
TRATAMENTO	CAVALARIA	1131	14	0	NM	NM	0,031	0,027	0,030	0,030	0,029	0,030	0,030	0,031	0,032
			15	0	0	0	0	0	0,011	0,012	0,012	0,010	0,010	0,012	0,012
			16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,018	0,021
	BUTANTÃ	97	4	0	0	0	0	0	0	0	0,023	0,022	0,022	0,020	0,021
			5	0	0	0	0	0	0	0	0	0,021	0,022	0,022	0,024
			6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,021	0,025	0,025
		209	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0,008	0,008	0,009	0,008
			7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,007	0,008
		219	4	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	0,009	0,018	0,024	0,024	0,023
			6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,048	0,047	0,050
		266	12	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
			13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,026	0,023	0,024
		636	12	0	0	0	0	0,037	0,035	0,035	0,036	0,035	0,036	0,036	0,036
			13	0	0	0	0	0	0	0	0	0,038	0,036	0,037	0,053
			6	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
			8	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
			10	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
		646	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0,005	0,005	0,005	0,006
			6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,015	0,015	0,015
			7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,008	0,008	0,008
			8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,017	0,017
		861	5	NM	NM	NM	0,009	0,010	0,010	0,010	0,009	0,009	0,010	0,009	0,009
		904	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,019	0,019	0,019
			10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,007	0,007	0,008
		909	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0,006	0,008	0,010	0,010

Tabela 8 – Compilação das formações que desapareceram ao longo do experimento

GRUPO DE ORIGEM	LOCAL DE ORIGEM	CAVALO	NÓDULO	D0	D15	D30	D45	D60	D75	D90	D120	D150	D180	D210	D240
TRATAMENTO	CAVALARIA	1134	6	0,049	0,043	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	não medido	0,000
	BUTANTÃ	904	3	0,022	0,020	0,018	0,016	0,018	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
			5	0,008	0,007	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
			6	0,012	0,011	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
		909	2	0,037	0,036	0,026	0,025	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela 9 – Comparação do volume total das formações no início e ao final do experimento (Grupos Tratamento e Controle)

GRUPO DE ORIGEM	VOLUME (cm ³)			VARIAÇÃO (D90 vs D0)	VARIAÇÃO (D240 vs D90)	VARIAÇÃO (D240 vs D0)
	INICIAL (D0)	INTERMEDIÁRIO (D90)	FINAL (D240)			
TRATAMENTO	73,48	69,96	70,29	-4,80%	0,48%	-4,34%
CONTROLE	76,83	77,30	77,81	0,61%	0,67%	1,28%

Gráfico 3 – Evolução do volume total das formações ao longo do experimento (Grupos Tratamento e Controle)

Tabela 10 – Evolução da soma dos volumes das formações por cavalos – Grupo Tratamento

GRUPO DE ORIGEM	LOCAL DE ORIGEM	CAVALO	VOLUME (cm³)											
			D0	D15	D30	D45	D60	D75	D90	D120	D150	D180	D210	D240
TRATAMENTO	CAVALARIA	450	0,785	0,782	0,814	0,795	0,794	0,799	0,794	0,805	0,814	0,794	0,825	0,812
		132	4,914	4,981	5,012	4,998	4,976	5,015	5,047	5,067	5,058	5,071	5,060	5,142
		737	16,989	17,316	16,755	16,240	15,998	16,266	15,822	15,953	16,086	15,947	16,192	16,989
		869	0,766	0,772	0,771	0,768	0,795	0,782	0,784	0,785	0,788	0,778	0,789	0,766
		1092	0,139	0,138	0,138	0,134	0,136	0,138	0,138	0,142	0,133	0,137	0,136	0,139
		1129	1,669	1,640	1,657	1,589	1,579	1,560	1,585	1,544	1,568	1,621	-	-
		1131	16,403	16,250	16,207	15,583	15,264	15,302	15,272	15,413	15,522	15,356	15,388	15,595
		1134	0,826	0,806	0,740	0,726	0,722	0,700	0,711	0,708	0,708	0,718	0,718	0,725
	BUTANTÃ	19	0,493	0,469	0,430	0,438	0,450	0,450	0,433	0,450	0,448	0,455	0,452	0,445
		97	0,430	0,422	0,431	0,427	0,425	0,429	0,434	0,450	0,475	0,491	0,506	0,499
		209	0,452	0,450	0,449	0,458	0,446	0,448	0,454	0,444	0,457	0,462	0,469	0,474
		219	0,644	0,625	0,642	0,622	0,642	0,602	0,624	0,602	0,643	0,715	0,701	0,709
		266	1,979	2,010	1,998	1,966	1,928	1,829	1,926	1,917	1,952	2,049	2,004	1,996
		636	2,807	2,855	2,820	2,860	2,843	2,898	2,884	2,954	2,926	3,001	2,988	3,004
		646	1,361	1,346	1,358	1,355	1,367	1,372	1,393	1,385	1,381	1,417	1,430	1,444
		856	1,596	1,548	1,552	1,556	1,572	1,583	1,616	1,590	1,583	1,585	1,616	1,640
		861	1,306	1,296	1,306	1,310	1,320	1,351	1,341	1,340	1,345	1,339	1,345	1,355
		900	16,865	16,678	16,711	16,501	16,425	16,489	16,278	16,512	16,572	16,603	16,565	16,631
		904	0,468	0,459	0,430	0,419	0,417	0,416	0,396	0,405	0,403	0,432	0,430	0,438
		909	2,426	2,380	2,245	2,212	2,140	2,014	1,938	1,943	1,961	2,006	2,053	2,111

Tabela 11 – Variação percentual da soma de volume das formações por cavalo nos três tempos principais – Grupo Tratamento

GRUPO DE ORIGEM	LOCAL DE ORIGEM	CAVALO	VARIAÇÃO (%)		
			VARIAÇÃO (D90 vs D0)	VARIAÇÃO (D240 vs D90)	VARIAÇÃO (D240 vs D0)
TRATAMENTO	CAVALARIA	450	1,23%	2,24%	3,49%
		132	2,70%	1,89%	4,64%
		737	-6,87%	2,75%	-4,31%
		869	2,30%	0,80%	3,12%
		1092	-0,98%	1,09%	0,10%
		1129	-5,05%	2,30%	-2,86%
		1131	-6,90%	2,12%	-4,93%
		1134	-13,97%	2,09%	-12,17%
	BUTANTÃ	19	-12,30%	2,77%	-9,86%
		97	0,95%	14,86%	15,94%
		209	0,46%	4,32%	4,80%
		219	-3,06%	13,62%	10,15%
		266	-2,68%	3,65%	0,87%
		636	2,72%	4,18%	7,02%
		646	2,40%	3,63%	6,12%
		856	1,29%	1,48%	2,79%
		861	2,75%	1,00%	3,77%
		900	-3,48%	2,17%	-1,38%
		904	-15,33%	10,45%	-6,48%
		909	-20,13%	8,95%	-12,98%

Tabela 12 - Evolução da soma dos volumes das formações por cavalos – Grupo Controle

GRUPO DE ORIGEM	LOCAL DE ORIGEM	CAVALO	VOLUME (cm ³)											
			D0	D15	D30	D45	D60	D75	D90	D120	D150	D180	D210	D240
CONTROLE	CAVALARIA	24	0,196	0,194	0,196	0,199	0,204	0,202	0,204	0,201	0,198	0,196	0,198	0,203
		35	31,026	31,458	31,203	31,244	31,219	31,395	31,241	31,288	31,522	31,381	31,305	31,417
		776	11,822	11,892	12,121	12,065	12,090	11,913	11,969	12,010	11,984	12,117	11,942	11,974
		1128	17,990	17,991	18,021	18,017	18,080	17,981	18,027	17,998	18,104	18,202	18,208	18,257
		1137	8,929	8,996	9,017	8,989	9,034	9,040	8,902	9,052	9,004	9,062	9,034	9,094
	BUTANTÃ	172	2,269	2,291	2,298	2,300	2,325	2,295	2,308	2,273	2,307	2,284	2,292	2,336
		371	0,203	0,204	0,208	0,207	0,204	0,209	0,210	0,210	0,204	-	-	-
		639	0,944	0,945	0,939	0,950	0,948	0,946	0,951	0,966	0,991	0,983	0,990	1,006
		761	1,391	1,402	1,423	1,412	1,404	1,400	1,416	1,419	1,399	1,415	1,419	1,426
		804	1,970	1,968	1,995	1,976	1,977	1,992	1,971	1,976	1,984	1,983	1,980	2,001
		908	0,091	0,092	0,088	0,092	0,099	0,095	0,098	0,092	0,094	0,094	0,094	0,100

Tabela 13 – Variação percentual da soma de volume das formações por cavalo nos três tempos principais – Grupo Controle

GRUPO DE ORIGEM	LOCAL DE ORIGEM	CAVALO	VARIAÇÃO (%)		
			VARIAÇÃO (D90 vs D0)	VARIAÇÃO (D240 vs D90)	VARIAÇÃO (D240 vs D0)
CONTROLE	CAVALARIA	24	4,12%	-0,69%	3,40%
		35	0,69%	0,56%	1,26%
		776	1,25%	0,04%	1,29%
		1128	0,21%	1,27%	1,48%
		1137	-0,30%	2,16%	1,85%
	BUTANTÃ	172	1,72%	1,20%	2,94%
		371	3,47%	-	-
		639	0,72%	4,21%	4,96%
		761	1,73%	-1,14%	0,57%
		804	0,03%	0,70%	0,73%
		908	7,84%	-4,03%	3,50%

6. DISCUSSÃO

6.1 DIFICULDADES E LIMITAÇÕES DO MÉTODO

As visitas periódicas às propriedades para medição e coleta de material foram por vezes dificultadas pela chuva e pelo excesso de lama presente na estrada, principalmente na Fazenda do Butantã. Este fato atrasou algumas visitas a essa propriedade, porém não comprometeu a análise de dados e os resultados obtidos deste trabalho.

Na Cavalaria de São Paulo, outro contratempo encontrado foi a indisponibilidade de alguns animais na data de certas visitas agendadas e a mudança repentina da rotina diária, como por exemplo, um evento inesperado. Todos os animais permaneceram em serviço durante o experimento, portanto saíam para patrulhamento nas ruas, o que impediu a medição e coleta de material do cavalo 1131 no momento D30 e do cavalo 1134 nos momentos D210 e D240. Este fato limitou a análise na comparação da média da variação dos volumes entre os momentos D90 versus D240 e do momento D0 versus D240 deste animal. O temperamento indócil e o difícil manejo de alguns pacientes também foram fatores limitantes nesta propriedade pois alguns animais relutavam a entrar no tronco de contenção para efetuar a medição e coleta de material. Em certas situações, fez-se necessário a utilização de métodos físicos de contenção. O animal 1129, após 30 minutos de tentativas, recusou-se a entrar no tronco nos momentos D210 e D240, o que comprometeu também a análise estatística de volume e média de volume comparativo que necessitavam utilizar-se destes dois momentos. Na Fazenda do Butantã, ocorreu a morte do animal 371 por motivo alheio ao estudo, o que impediu a medição e coleta de material a partir do momento D180.

Apesar do método escolhido para aferição do volume das formações ser completamente indolor, vários animais apresentaram “cócegas” durante o procedimento devido à grande sensibilidade das áreas de base de cauda e períneo no momento da aproximação e toque do paquímetro na região. Este leve desconforto levava alguns animais a demonstrar o incômodo através de inquietação e

movimentação de garupa e membros pélvicos, dificultando assim a mensuração precisa das formações. Utilizou-se alimento como forma de distração para amenizar esta sensação e poder assim realizar a medição das formações de forma adequada.

Os cavalos utilizados neste experimento foram pesados com fita de peso na Cavalaria de São Paulo e com balança industrial na Fazenda do Butantã. Portanto, devido à falta de precisão da fita de peso, estimou-se um erro de 10% para mais ou para menos no peso dos animais da Cavalaria de São Paulo. O paquímetro digital apresenta uma precisão de 0,001 cm. Uma limitação importante encontrada no momento da medição foi a dificuldade de obter acesso e encaixe do paquímetro às regiões de dobras e de pele na área perineal. Esta situação causou transtornos e, em casos extremos, descarte das formações localizadas nestas áreas de difícil acesso devido à impossibilidade de obter medição confiável.

Vale a pena salientar que o sabor amargo e desagradável da cimetidina demonstrou ser uma limitação. Alguns animais não aceitaram bem a droga diluída em água e foi necessário administrar o fármaco misturado na ração para evitar desperdício e perda residual.

6.2 COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS TRATAMENTO E CONTROLE

Baseado nos resultados obtidos na Tabela 1, verifica-se uma diferença estatisticamente significativa entre a média das reduções das formações entre os grupos Controle e Tratamento no período entre D0 e D90. No cômputo geral das 135 formações do grupo Tratamento, foi verificada uma redução média de volume de 3,64%, enquanto que no grupo Controle as 94 formações analisadas tiveram um aumento médio de volume de 1,06%. Tal resultado mostra que, de forma global, a droga causou uma alteração no tamanho médio dos melanomas em comparação com o grupo Controle durante o período em que foi ministrada.

Ainda que se tomem outros métodos de aferição do volume das formações, tais como soma do volume de formações por cavalo ou média do volume das formações de um mesmo animal, obtém-se resultados semelhantes. Para a soma do volume de melanomas por cavalo, o grupo Tratamento apresentou redução média de 3,70%,

enquanto que o grupo Controle apresentou aumento médio de 1,95%. Para a média do volume das formações de um mesmo cavalo, o grupo Tratamento obteve redução média de 3,81%, enquanto o grupo Controle mostrou aumento médio de 1,77%. Ambos os resultados são estatisticamente significativos com 95% de confiança.

Quando se compara o período de D90 a D240, no qual houve a suspensão do tratamento com cimetidina, verifica-se uma tendência estatisticamente significativa de aumento médio do volume de formações do grupo Tratamento em comparação com o grupo Controle, independentemente da métrica de aferição de tamanho das formações utilizada. No cômputo geral das 135 formações do grupo Tratamento, foi verificada um aumento médio de volume de 2,96%, enquanto que no grupo Controle os 94 melanomas analisados tiveram um aumento médio de volume de 0,16%, o que indica um valor médio estável. Para a soma do volume de formações por cavalo, o grupo Tratamento apresentou aumento médio de 4,42%, enquanto que o grupo Controle apresentou aumento médio de 0,14%, valor também estável. Para a média do volume das formações de um mesmo cavalo, o grupo Tratamento obteve aumento médio de 2,07%, enquanto o grupo Controle mostrou uma redução média de 0,07%, mantendo-se praticamente estável. A diferença de resultados nas três métrica é estatisticamente significativa com 95% de confiança.

Por último, ao se comparar o início (D0) com o final do experimento (D240), verificam-se, para o grupo Tratamento, pequenas oscilações de média (entre -1,85% e 0,56%) de variação de volume das formações de acordo com a métrica utilizada. Tomado o cômputo de todos os melanomas, o grupo Tratamento apresentou redução média de volume de 0,96%, enquanto o grupo Controle mostrou aumento médio de 1,15%. Quando se analisa a média de volume por cavalo, o grupo tratamento apresentou redução média de 1,85%, enquanto no grupo Controle obteve-se aumento médio de 1,33%. As diferenças entre médias apresentadas são estatisticamente significativas com 95% de confiança. Quando se analisa a soma do volume das formações por animal, o grupo Tratamento apresentou ligeiro aumento de 0,56% de média, enquanto no grupo Controle foi verificado um aumento médio de 2,06%. Tal diferença, porém, não foi estatisticamente significativa, dada a grande dispersão dos dados, com desvio padrão superior a 7%, e o pequeno tamanho das amostras, que envolviam 20 e 11 cavalos para os grupos Tratamento e Controle respectivamente.

6.3 COMPARAÇÃO ENTRE CAVALOS JOVENS E IDOSOS

Baseado nos resultados obtidos na Tabela 2, verificou-se a eventual diferença de comportamento entre os cavalos jovens (até 14 anos de idade) e idosos (acima de 14 anos de idade). Quando analisada a variação de volume das formações entre o início do experimento (D0) e o final do tratamento (D90), verifica-se uma diferença de média entre os grupos em todas as métricas utilizadas. No cômputo geral das 61 formações dos cavalos jovens, foi verificada uma redução média de volume de 5,97%, enquanto que nos animais idosos a redução média de volume nas 74 formações analisados foi de 1,73%. Tal diferença de média é estatisticamente significativa com 95% de confiança. Quando se considera a soma dos volumes de um animal, a redução média entre os 9 cavalos jovens foi de 6,73%, enquanto que a redução média entre os 11 animais idosos foi de 1,22%. Quando se analisa a média do volume de formações por cavalo, verifica-se que os animais jovens apresentaram redução média de 6,76%, enquanto que os cavalos idosos obtiveram redução média de 1,40%. Nas duas métricas apresentadas, a diferença entre as médias apresentou valor-p inferior a 8%, o que sugere fortemente que as médias entre os grupos seja diferente, mas não atende ao critério de significância estatística do presente estudo (valor-p inferior a 5%).

Quando se compara o período de D90 a D240, no qual houve a suspensão do tratamento com cimetidina, não foi verificada diferença estatisticamente significativa para a variação de volume das formações entre os cavalos jovens e idosos em nenhuma das métricas utilizadas. Especificamente para a métrica de soma do volume de formações por cavalo, a média entre animais jovens foi de aumento de 4,20%, enquanto entre os idosos verificou-se aumento médio de 4,41%. A diferença entre as médias entre os dois grupos apresentou valor-p de 91,51%, ou seja, é bastante improvável que haja diferença de comportamento entre os dois grupos. Quando se analisam as formações isoladas, o aumento médio entre os jovens foi de 3,29%, enquanto que o aumento médio entre os idosos foi de 2,69%. Mais uma vez, o valor-p obtido para a diferença entre as médias foi de 49,13%, o que mostra que a diferença entre as médias não tem significância estatística. Por último, quando se analisa a média de volume das formações por cavalo, entre os jovens foi observada um aumento médio de 2,37%, enquanto entre os idosos tal aumento foi de 1,84%. A

diferença entre as médias dos dois grupos apresentou valor-p de 53,22%, o que mostra que tal diferença não possui significância estatística.

Por último, ao se comparar o início (D0) com o final do experimento (D240), verifica-se uma diferença de médias entre os dois grupos para todas as métricas utilizadas. Tomado o cômputo de todas as formações, os animais jovens apresentaram redução média de volume de 3,14%, enquanto os animais idosos apresentaram aumento médio de 0,84%. Ao se considerar a média de volume das formações por cavalo, verifica-se que os cavalos jovens apresentaram redução média de 4,68%, enquanto entre os cavalos idosos verificou-se aumento médio de 0,38%. A diferença entre as médias é estatisticamente significativa em ambas as métricas com 95% de confiança. Quando se analisa a soma dos volumes por cavalo, verifica-se que os animais jovens apresentaram redução média de 2,82%, enquanto que entre os animais idosos obteve-se um aumento médio de 3,02%. O valor-p obtido para a diferença entre as médias foi de 10,61%, o que indica que as médias são, provavelmente, diferentes, apesar do valor obtido ser superior ao critério de significância estatística.

6.4 COMPARAÇÃO ENTRE BUTANTÃ E CAVALARIA

Baseado nos resultados obtidos na Tabela 3, verificou-se se há eventual diferença de comportamento entre os cavalos da Fazenda Butantã e os da Cavalaria de São Paulo. Quando analisada a variação de volume das formações entre o início do experimento (D0) e o final do tratamento (D90), não se verifica uma diferença de média entre os grupos estatisticamente significativa em nenhuma das métricas utilizadas. Dessa forma, a diferença de manejo não influenciou a resposta dos animais ao tratamento com cimetidina.

Quando se compara o período de D90 a D240 ou ainda o período de D0 a D240, verifica-se que as diferenças entre as médias, independentemente da métrica utilizada, não supera 3%, o que indica pequena ou nenhuma correlação entre o tipo de manejo e a resposta dos animais ao tratamento.

6.5 INTERVALO DE CONFIANÇA PARA O GRUPO TRATAMENTO

Além da diferença apresentada entre os grupos, levantou-se também o intervalo de confiança (95%) para a variação média do volume das formações do grupo Tratamento ao longo do período do experimento. Além do intervalo de confiança para a média, foi realizada a estimativa pontual para a resposta ao tratamento de um animal tomado isoladamente, de forma a verificar a efetividade do medicamento de forma individualizada.

Ao se analisar a Tabela 4, verifica-se que, independentemente da métrica utilizada, ocorre uma redução média do volume das formações quando se comparam o final do tratamento (D90) com o início do experimento (D0). A redução média observada foi de 3,64% para as formações isoladas, 3,70% para a soma das formações por cavalo e de 3,80% quando tomada a média do volume dos melanomas por cavalo.

Contudo, quando se analisa o final do experimento (D240) com o seu início (D0), não é possível afirmar, com 95% de confiança, que ocorre redução do volume médio das formações em nenhuma das métricas utilizadas, já que, em média, ocorre aumento de 2 a 4% do volume das formações entre D90 e D240.

Quando se realiza a estimativa pontual para um cavalo da redução do volume de formações entre D0 e D90, depara-se com uma alta dispersão dos resultados obtidos em torno da média, o que aumenta consideravelmente a amplitude do intervalo de confiança. Dessa forma, apesar do efeito médio do tratamento ser de promover a redução das formações, conforme a estimativa supracitada, verifica-se que o intervalo de confiança para um único cavalo inclui, independentemente da métrica utilizada, possíveis aumentos de volume das formações. Tal fato já havia sido verificado ao longo do experimento, quando, entre os 20 cavalos do grupo Tratamento, nove apresentaram aumento de até 3% no volume das formações entre D0 e D90.

6.6 AVALIAÇÃO DO VOLUME TOTAL DE FORMAÇÕES

Ao se analisar a Tabela 9, obtém-se resultados globais a respeito da evolução do volume das formações analisados ao longo do experimento. No grupo Tratamento, verificou-se uma redução de 4,34% entre o início (D0) e o final do experimento (D240). No grupo Controle, foi observado um aumento global no volume de formações de 1,28%. Para o levantamento do grupo Controle, desconsiderou-se o cavalo 371, que morreu ao longo do experimento.

Este efeito de redução de volume total de melanomas do Grupo Tratamento sugere ter sido em decorrência da administração da cimetidina como tratamento de melanoma nestes animais. O aumento observado no Grupo Controle após 240 dias de evolução corrobora a hipótese de que, caso não se institua nenhuma forma de tratamento para esta afecção, a tendência é a de que as formações apresentarão, eventualmente, um crescimento desigual e lento, com características exclusivas de cada animal acometido.

6.7 SURGIMENTO DE NOVAS FORMAÇÕES – GRUPO CONTROLE

De acordo com os dados demonstrados na Tabela 6, o surgimento de novas formações nos animais pertencentes ao Grupo Controle ocorreu em 4 animais da Cavalaria de São Paulo e em 2 animais da Fazenda do Butantã. Vale a pena ressaltar que 3 dos 4 cavalos da Cavalaria que demonstraram este comportamento eram animais jovens, com idades entre 9 e 11 anos, o que indica que este fato pode ocorrer independentemente ao fator idade e estar correlacionado com a própria evolução individualizada da doença.

6.8 SURGIMENTO DE NOVAS FORMAÇÕES– GRUPO TRATAMENTO

A Tabela 7 mostra o surgimento de novas formações nos animais do Grupo Tratamento das duas propriedades participantes deste experimento. O animal 1131 da Cavalaria de São Paulo apresentava um nódulo não mensuráveis ao início do experimento e esta mesma formação aumentou de volume no momento D45, permanecendo estável até o final do presente estudo.

Já na Fazenda do Butantã, nove cavalos apresentaram surgimento de novas formações, em sua maioria (sete animais) após o término do tratamento. O cavalo 861 manifestou a alteração de volume de um nódulo não mensurável já existente no momento D60, o qual permaneceu inalterado até o momento D240. O animal 636 exibiu o surgimento de um nódulo novo no momento D60 que não sofreu variação significativa até o final deste experimento. Os demais pacientes apresentaram o aparecimento de novas formações somente após o momento D90, o que sugere que a cimetidina não possui efetividade comprovada quando se trata da contenção de surgimento de novas formações após a suspensão da administração da droga.

6.9 RESPOSTA DOS ANIMAIS AO TRATAMENTO

É importante citar a resposta obtida dos animais do Grupo Tratamento à administração da cimetidina. A partir da análise das Tabelas 10 e 11, verifica-se que, dos 20 animais pertencentes a este grupo, 11 cavalos apresentaram redução das formações quando comparados os volumes totais por animal e as médias dos volumes dos melanomas nos momentos D90 e D0. Os nove animais restantes não responderam positivamente ao tratamento, ou seja, não apresentaram redução das formações durante a terapia com o fármaco.

A redução da soma dos volumes das formações por cavalo e das médias dos volumes foi verificada em seis animais da Fazenda do Butantã e cinco cavalos da Cavalaria de São Paulo. Uma pequena redução que variou de 1 a 7% ocorreu em sete dos 11 animais e no restante (quatro cavalos) a diminuição do volume foi bastante significativa, variando de 12 a 20%. Quanto ao aumento da soma do volume das

formações por cavalo, verifica-se que, dentre os nove animais que apresentaram tal comportamento, o maior aumento observado, dentro do Grupo Tratamento, foi de 2,75%. Nota-se que ao final do experimento, oito dos onze animais que demonstraram redução do volume total de formações, apresentaram um aumento de volume, porém este aumento mostrou-se menor do que o apresentado inicialmente, indicando que o tamanho dos melanomas não atingiu o valor inicialmente observado no momento D0. Este comportamento também foi observado em um estudo prévio de Laus et al (2010) onde o animal que respondeu à administração de cimetidina demonstrou um aumento subsequente à redução, estabilizando com tamanho menor do que inicialmente mensurado ao início do experimento.

Ao se efetuar a análise dentro do Grupo Controle, por meio das Tabelas 12 e 13, verifica-se que houve aumento da soma do volume das formações por cavalo em dez dos 11 cavalos verificados. O aumento observado variou de 0,03 a 7,84%. A redução observada no cavalo restante foi de 0,30%.

Ao fazer a comparação entre os grupos Tratamento e Controle, infere-se, como indicado anteriormente, que há uma diferença estatisticamente significativa entre a variação média da soma do volume das formações entre os grupos analisados, apesar da alta dispersão verificada em ambos os grupos.

Ao observar a Tabela 8, nota-se que os três animais que apresentaram desaparecimento das formações pertenciam ao Grupo Tratamento e que o mesmo comportamento não ocorreu nos cavalos do Grupo Controle. O desaparecimento verificou-se em um período que variou entre 15 e 75 dias após o início do tratamento com cimetidina, o que sugere que a administração da droga nestes animais teve um efeito positivo tanto na diminuição do tamanho das formações quanto na redução total e desaparecimento das formações apresentadas na tabela. Os animais 232 e 904 pertencentes ao grupo Tratamento da Fazenda do Instituto Butantã também apresentaram a diminuição de um e três nódulos respectivamente, a ponto de se tornarem não mensuráveis, durante o período de administração da droga.

A grande dispersão do padrão de resposta dos animais analisados à administração da cimetidina verificada neste trabalho questiona a efetividade deste fármaco como forma de tratamento clínico para melanoma em equinos, principalmente quanto ao mecanismo de ação do fármaco atuante nesta afecção. A diferença na

efetividade pode estar relacionada ao tipo de melanoma sendo submetido ao tratamento. Segundo Laus et al (2010), a variação da efetividade da cimetidina pode estar relacionada à diferenciação funcional, metabolismo celular e origem embrionária dos tumores e não estar relacionada à taxa de crescimento. Assim como pode também estar associada ao papel da histamina na angiogênese de diferentes tipos celulares (NATORI et al., 2005). A absorção oral variável e complexa da cimetidina em equinos pode ser um importante fator na efetividade e qualidade da resposta observadas nos animais do grupo Tratamento no presente estudo. Mais estudos se fazem necessários para obter um melhor entendimento dos aspectos envolvidos na farmacocinética da cimetidina em cavalos assim como nas suas vias de eliminação (SMYTH et al., 1990).

Além de seu efeito imunomodulador e anti-inflamatório, a cimetidina atua através de diferentes vias na inibição de crescimento tumoral e metástase, como indução de apoptose, inibição de adesão de células tumorais e inibição da angiogênese (KUBECOVA et al., 2011). Vários estudos em humanos comprovam que o fármaco possui atuação no sistema imune quando utilizado em associação com o tratamento de câncer de cólon, câncer de mama, câncer de ovário e neoplasia cerebral (PANTZIARKA et al., 2014).

Contrário ao estudo conduzido por Goetz et al (1990) que relatou uma diminuição de até 90% no tamanho dos melanomas em dois de três dos animais tratados, no presente estudo a redução máxima de volume das formações observada em um pequeno número de animais do grupo Tratamento foi de 20% e não se pode afirmar quais foram os mecanismos de ação envolvidos nessa redução.

O tratamento de melanomas em equinos compreende inúmeras variáveis e fatores de risco, desde sua etiologia até os mecanismos de ação da droga, taxa de absorção da cimetidina, papéis de citocinas inflamatórias e da histamina no ambiente tumoral, tipos celulares envolvidos e identificação do grau de malignidade dos tumores, entre outros. Devido à grande dispersão dos dados e das respostas individuais e muito variadas dos animais pertencentes ao grupo Tratamento deste trabalho, estudos futuros se fazem necessários para entender melhor o papel de cada um destes fatores e sua possível interação, tanto entre eles quanto com a neoplasia em si. É importante ressaltar o conhecimento do veterinário para os riscos e sintomatologia inespecíficas desta afecção, uma vez que, na maioria dos casos, este

tipo de neoplasia é considerado benigno, não se conhecendo o seu real potencial para malignidade e metástase.

7. CONCLUSÕES

- A cimetidina, na dose de 18 mg/kg VO BID, apresenta ação sobre os melanomas em equinos tordilhos.
- A cimetidina mostrou-se eficaz na redução de melanomas no grupo Tratamento em relação ao grupo Controle, porém este comportamento apresentou-se bastante variável e individual, ou seja, a efetividade da ação do medicamento não é garantida para todos os cavalos.
- A cimetidina não foi eficaz no controle do surgimento de novas formações durante a sua administração.
- Após sua suspensão, a cimetidina não demonstrou possuir efeito em relação à manutenção da redução do volume e da média do volume das formações.
- Após a sua suspensão, a cimetidina não foi eficaz no controle do aparecimento de novas formações.

REFERÊNCIAS

ADAMS, H.R. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 1034 p.

BOYLE, G.M.; PEDLEY, J.; MARTYN, A.C.; BANDUCCI, K.J.; STRUTTON, G.M.; BROWN, D.A.; BREIT, S.N.; PARSONS, P.G. Macrophage Inhibitory Cytokine-1 Is Overexpressed in Malignant Melanoma and Is Associated with Tumorigenicity. **Journal of Investigative Dermatology**, v.129, n.2, p.383-391, 2009.

BURTIN, C.; NOIROT, C.; SCHEINMANN, P.; GALOPPIN, L.; SABOLOVIC, D.; BERNARD, P. Clinical improvement in advanced câncer disease after treatment combining histamine and H2-antihistaminics (ranitidine or cimetidine). **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, v.24, n.2, p. 161-167, 1988.

CAMPAGNE, C.; JULÉ, S.; BERNEX, F.; ESTRADA, M.; AUBIN-HOUZELSTEIN, G.; PANTHIER, J.J.; EGIDY, G. RACK1, a clue to the diagnosis of cutaneous melanomas in horses. **Biomed Central Veterinary Research**, v.8, n.95, 2012. Disponível em <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-8-95>. Acesso em 11 maio 2017.

CRIADO, P.R.; CRIADO, R.F.J.; MARUTA, C.W.; FILHO, C.A.M. Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, n.2, p. 195-210, 2010.

EGIDY, G.; JULÉ, S.; BOSSÉ, P.; BERNEX, F.; GEFFROTIN, C.; VINCENT-NAULLEAU, S.; HORAK, V.; SASTRE-GARAU, X.; PANTHIER, J.J. Transcription analysis in the MeLiM swine model identifies RACK 1as a potential marker of malignancy for human melanocytic proliferation. **Molecular Cancer**, v.7, 2008. Disponível em <http://www.molecular-cancer.com/content/7/1/34>. Acesso em 26 maio 2017.

FALUS, A.; HEGYESI, H.; LÁZÁR-MOLNÁR, E.; PÓS, Z.; LÁSZLÓ, V.; DARVAS, Z. Paracrine and autocrine interactions in melanoma: histamine is a relevant player in local regulation. **Trends in Immunology**, v.22, n.12, p. 648-652, 2001.

FALUS, A., GILICZE, A. Tumor formation and antitumor immunity; the overlooked significance of histamine. **Journal of Leukocyte Biology**, v.96, p. 225-231, 2014.

FINTL, C.; DIXON, P.M. A review of five cases of parotid melanoma in the horse. **Equine Veterinary Education**, v.13, n.1, p. 17-24, 2001.

FLEURY, C.; BÈRARD, F.; BRIGITTE, B.; THOMAS, L. The Study of Cutaneous Melanomas in Camargue-Type Gray-Skinned Horses (1): Clinical-Pathological Characterization. **Pigment Cell Research**, v.13, pt.1, p.39-46, 2000.

FLEURY, C.; BÈRARD, F.; LEBLOND, A.; FAURE, C.; GANEM, N.; THOMAS, L. The Study of Cutaneous Melanomas in Camargue-Type Gray-Skinned Horses (2): Epidemiological Survey. **Pigment Cell Research**, v.13, pt.2, p.47-51, 2000.

GOETZ, T.E.; OGILVIE, G.K.; KEEGAN, K.G.; JOHNSON, P.J. Cimetidine for treatment of melanomas in three horses. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.196, p. 449-452, 1990.

GABRILOVICH, D.; OSTRAND-ROSENBERG, S.; BRONTE, V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumors. **Nature Reviews Immunology**, v.12, p.253-268, 2012.

GROOM, L.M.; SULLINS, K.E. Surgical excision of large melanocytic tumours in grey horses: 38 cases (2001-2013). **Equine Veterinary Education**, v.29, n.6, 2017. Disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eve.12767/full>. Acesso em 02 maio 2017.

HEGYESI, H.; SOMLAI, B.; VARGA, V.L.; TOTH, G.; KOVACS, P.; MOLNAR, E.L.; LASZLO, V.; KARPATI, S.; RIVERA, E.; FALUS, A.; DARVAS, Z. Suppression of Melanoma Cell Proliferation by Histidine Decarboxylase Specific Antisense Oligonucleotides. **Journal of Investigative Dermatology**, v.117, p.151-153, 2001.

KNOTTENBELT, D.C. **Principles & Practice of Equine Dermatology**. 2ª ed. London: Saunders Elsevier, 2009. 502p.

KNYCH, H.K.; STANLEY, S.D.; ARTHUR, R.M.; MCKEMIE, D.S. Disposition of the anti-ulcer medications ranitidine, cimetidine, and omeprazole following administration of multiple doses to exercised Thoroughbred horses. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.40, p.92-96, 2016.

KUBECOVA, M.; KOLOSTOVA, K.; PINTEROVA, D.; KACPRZAK, G.; BOBEK, V. Cimetidine: Na anticancer drug? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.42, p.439-444, 2011.

LAUS, F.; CERQUETELLA, M.; PAGGI, E.; IPPEDICO, G.; ARGENTIERI, M.; CASTELLANO, G.; SPATERNA, A.; TESEI, B. Evaluation of cimetidine as a therapy for dermal melanomatosis in grey horses. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v.65, n.2, p.48-52, 2010.

LIN, C.Y.; BAI, D.J.; YUAN, H.Y.; WANG, K.; YANG, G.L.; HU, M.B.; WU, Z.Q.; Li, W. Perioperative cimetidine administration promotes peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes in patients with gastrointestinal cancer: Results of a randomized controlled clinical trial. **World Journal of Gastroenterology**, v.10, n.1, p.136-142, 2004.

MacGILLIVRAY, K.C.; SWEENEY, R.W.; DEL PIERO, F. Metastatic Melanoma in Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, p.452-456, 2002.

McFADYEAN, J. Equine Melanomatosis. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**. v.46, p.186-204, 1933.

MEDINA, V.A.; RIVERA, E.S. Histamine receptors and cancer pharmacology. **British Journal of Pharmacology**, v.161, p.755-767, 2010.

METCALFE, L.V.A.; O'BRIEN, P.J.; PAPAKONSTANTINO, S.; CAHALAN, D.; McALLISTER, H.; DUGGAN, V.E. Malignant melanoma in a grey horse: case presentation and review of equine melanoma treatment options. **Irish Veterinary Journal**, v.66, 2013. Disponível em <http://www.irishvetjournal.org/content/66/1/22>. Acesso em 03 junho 2017.

MOORE, J.S.; SHAW, C.; SHAW, E.; BUECHNER-MAXWELL, V.; SCARRATT, W.K.; CRISMAN, M.; FURR, M.; ROBERTSON, J. Melanoma in horses: Current perspectives. **Equine Veterinary Education**, v.25, n.3, p.144-151, 2013.

NATORI, T.; SATA, M.; RYOZO, N.; MAKUUCHI, M. Cimetidine inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.59, p.56-60, 2005.

PANTZIARKA, P.; BOUCHE, G.; MEHEUS, L.; SUKHATME, V.; SUKHATME, V.P. Repurposing drugs in oncology (ReDO) - cimetidine as an anti-cancer agent. **ecancermedicalscience**, v.8, n.845, 2014. Disponível em <http://nrs.harvard.edu/urn-3:HUL.InstRepos:13581211>. Acesso em 16 abril 2017.

PHILLIPS, J.C.; LEMBCKE, L.M. Equine Melanocytic Tumors. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.29, p.673-687, 2013.

PIELBERG, G.R.; GOLOVKO, A.; SUNDSTRÖM, E.; CURIK, I.; LENNARTSSON, J.; SELTENHAMMER, M.H.; DRUML, T.; BINNS, M.; FITZSIMMONS, C.; LINDGREN, G.; SANDBERG, K.; BAUMUNG, R.; VETTERLEIN, M.; STRÖMBERG, S.; GRABHERR, M.; WADE, C.; LINDBLAD-TOH, K.; PONTÉN, F.; HELDIN, C.H.; SÖLKNER, J.; ANDERSSON, L. A *cis*-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. **Nature Genetics**, v.40, p.1004-1009, 2008.

ROBINSON, N.; SPRAYBERRY, K. **Current Therapy in Equine Medicine**. 6^a ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2009. 1104 p.

SAMS, R.A.; GERKEN, D.F.; DYKE, T.M.; REED, S.M.; ASHCRAFT, S.M. Pharmacokinetics of intravenous and intragastric cimetidine in horses I. Effects of intravenous cimetidine on pharmacokinetics of intravenous phenylbutazone. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.20, p. 355-361, 1997.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H. **Equine Dermatology**. 2^a ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2011. 552 p.

SELTENHAMMER, M.H.; SIMHOFER, H.; SCHERZER, S.; ZECHNER, P.; CURIK, I.; SÖLKNER, J.; BRANDT, S.M.; JANSEN, B.; PEHAMBERGER, H.; EISENMENGER, E. Equine melanoma in a population of 296 grey Lipizzaner horses. **Equine Veterinary Journal**, v.35, n.2, p. 153-157, 2003.

SELTENHAMMER, M.H.; SUNDSTRÖM, E.; MEISSLITZER-RUPPITSCH, C.; CEJKA, P.; KOSIUK, J.; NEUMÜLLER, J.; ALMENDER, M.; MAJDIC, O.; STEINBERGER, P.; LOSERT, U.M.; STÖCKL, J.; ANDERSSON, L.; SÖLKNER, J.; VETTERLEIN, M.; GOLOVKO, A. Establishment and characterization of a primary and a metastatic melanoma cell line from Grey horses. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v.50, p.56-65, 2014.

SELTENHAMMER, M.H.; HEERE-RESS, E.; BRANDT, S.; DRUML, T.; JANSEN, B.; PEHAMBERGER, H.; NIEBAUER, G.W. Comparative Histopathology of Grey-Horse-Melanoma and Human Malignant Melanoma. **Pigment Cell Research**, v.17, p.674-681, 2004.

SHAHID, M.; TRIPATHI, T.; SOBIA, F.; MOIN, S.; SIDDIQUI, M.; KHAN, R.A. Histamin, Histamine receptors, and their Role in Immunomodulation: Na Updated Systemic Review. **The Open Immunology Journal**, v.2, p.9-41, 2009.

SMYTH, G.B.; DURAN, S.; RAVIS, W.; CLARK, C.R. Pharmacokinetic studies of cimetidine hydrochloride in adult horses. **Equine Veterinary Journal**, v.22, n.1, p.48-50, 1990.

SUNDBERG, J.P.; BURNSTEIN, T.; PAGE, E.H.; KIRKHAM, W.W.; ROBINSON, F.R. Neoplasm of equidae. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.170, p.150-152, 1977.

SUNDSTRÖM, E.; IMSLAND, F.; MIKKO, S.; WADE, C.; SIGURDSSON, S.; PIELBERG, G.R.; GOLOVKO, A.; CURIK, I.; SELTENHAMMER, M.H.; SÖLKNER, J.; LINDBLAD-TOH, K.; ANDERSSON, L. Copy number expansion of the *STX17* duplication in melanoma tissue from Grey horses. **Biomed Central Genomics**, v.13, n.365, 2012. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3443021/>. Acesso em 29 abril 2017.

SUTTON, R.H.; COLEMAN, G.T. **Melanoma and the Greying Horse**. Rural Industries & Development Cooperation. Barton, 1997. 42 p.

TAKAHASHI, K.; TANAKA, S.; ICHIKAWA, A. Effect of Cimetidine on Intratumoral Cytokine Expression in an Experimental Tumor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.281, n.5, p.1113-1119, 2001.

TEIXEIRA, R.B.C.; RENDAHL, A.K.; ANDERSON, S.M.; MICKELSON, J.R.; SIGLER, D.; BUCHANAN, B.R.; COLEMAN, R.J.; McCUE, M.E. Coat Color Genotypes and Risk and Severity of Melanoma in Gray Quarter Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.27, p.1201-1208, 2013.

TOMITA, K.; OKABE, S. Exogenous Histamine Stimulates Colorectal Cancer Implant Growth via Immunosuppression in Mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.97, p.116-123, 2005.

ÜNAL, B.; ALAN, S.; BASSORGUN, C.I.; KARAKAS, A.A.; ELPEK, G.Ö.; ÇİFTÇIOĞLU, M.A. The divergent roles of growth differentiation factor-15 (GDF-15) in benign and malignant skin pathologies. **Archives of Dermatological Research**, v.307, n.7, p.551-557, 2015. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25690161>. Acesso em 21 maio 2017.

VALENTINE, B.A. Equine Melanocytic Tumors: A Retrospective Study of 53 Horses (1988 to 1991). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.9, n.5, p.291-297, 1995.

APÊNDICE - Ficha usada para a identificação dos animais do trabalho**FICHA/ANIMAL N.:**ESTABELECIMENTO: _____
_____NOME: _____
_____SEXO: _____
_____IDADE: _____
_____RAÇA: _____
_____PESO: _____
_____PROPRIETÁRIO: _____
_____NÚMERO DE NÓDULOS EM BASE DE
CAUDA: _____NÚMERO DE NÓDULOS EM
PERÍNEO: _____NÚMERO DE NÓDULOS EM
SABUGO: _____NÚMERO DE NÓDULOS
TOTAIS: _____DATA INÍCIO DO
TRATAMENTO: _____DATA FINAL DO
TRATAMENTO: _____QUANTIDADE DE CIMETIDINA
ADMINISTRADA: _____

FORMA DE ADMINISTRAÇÃO DA CIMETIDINA:

☐ RAÇÃO☐ VIA ORAL

EXAME FÍSICO:

F.C: _____

F.R: _____

MUCOSAS: _____

OBSERVAÇÕES: _____

☐ COLETA DE SANGUE:

☐ FOTOS:

☐ MEDIDAS:

NÓDULO N.	MEDIDAS	LOCALIZAÇÃO	CARACTERÍSTICAS

APARECIMENTO DE NOVOS
NÓDULOS: _____

MAPEAMENTO DOS NÓDULOS: