

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ANTHONY BROERING FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-ANATOMOHISTOPATOLÓGICA DO
HEMANGIOSSARCOMA EM JIBÓIA ARCO-ÍRIS (*EPICRATES CENCHRIA*) E SUA
RELAÇÃO COM VÍRUS ONCOGÊNICO.**

LAGES, 2023

ANTHONY BROERING FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-ANATOMOHISTOPATOLÓGICA DO
HEMANGIOSSARCOMA EM JIBÓIA ARCO-ÍRIS (*EPICRATES CENCHRIA*) E SUA
RELAÇÃO COM VÍRUS ONCOGÊNICO.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Joandes Henrique Fonteque

Coorientador: Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa

LAGES, 2023

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Universitária Udesc,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Ferreira, Anthony Broering
CARACTERIZAÇÃO
CLÍNICO-ANATOMOHISTOPATOLÓGICA DO
HEMANGIOSSARCOMA EM JIBÓIA ARCO-ÍRIS (EPICRATES
CENCHRIA) E SUA RELAÇÃO COM VÍRUS ONCOGÊNICO /
Anthony Broering Ferreira. -- 2023.
77 p.

Orientador: Joandes Henrique Fonteque
Coorientador: Ubirajara Maciel da Costa
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação , Lages, 2023.

1. Serpente. 2. Patologia. 3. Virologia. I. Fonteque, Joandes
Henrique. II. Costa, Ubirajara Maciel da. III. Universidade do
Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação . IV. Titulo.

ANTHONY BROERING FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-ANATOMOHISTOPATOLÓGICA DO
HEMANGIOSSARCOMA EM JIBÓIA ARCO-ÍRIS (*EPICRATES CENCHRIA*) E SUA
RELAÇÃO COM VÍRUS ONCOGÊNICO.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Banca examinadora:

Coorientador:



Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa
Universidade do Estado de Santa Catarina

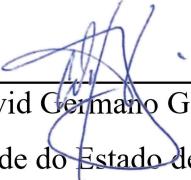
Documento assinado digitalmente

 HATAWA MELO DE ALMEIDA MONTEIRO
Data: 19/09/2023 20:31:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membros:

Profa. Dra. Hatawa Melo de Almeida Monteiro
Universidade Federal do Piauí

Membros:



Prof. Dr. David Germano Gonçalves Schwarz
Universidade do Estado de Santa Catarina

Lages, 24 de julho de 2023

A todos que me fizeram mais forte ao longo
dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais. Seu Ferreira e dona Matilde, obrigado por vocês sempre acreditaram em mim. Vocês nunca mediram esforços para me ajudar e sempre estão de prontidão para me acolher em todos os momentos e decisões. Vocês são meus maiores exemplos.

Gostaria de agradecer também às minhas irmãs, Maryana e Thuany, vocês também sempre acreditaram em mim, e muitas vezes muito mais do que eu mesmo acreditei! Vocês são minhas inspirações, tenho muito orgulho de ser irmão de vocês.

Meu agradecimento especial a Monica, por me fortalecer mesmo quando as coisas pareciam não fazer mais sentido. Tenho muito orgulho e sou muito feliz por te ter comigo ao longo de toda minha caminhada, nada seria igual se eu não tivesse teu apoio.

Obrigado aos meus avós por estarem sempre olhando por mim, independentemente de onde estiverem, sei que sempre estão me guiando. A benção vô Pedro, a benção vó Valda, a benção vó Lice, a benção vô Ari.

Obrigado também ao Tom, meu irmão de vida, não importa o tempo que passa, não importa o que aconteça, tu sempre esteve do meu lado e foi um pilar me mantendo em pé, obrigado por sempre ser meu ombro e por toda parceria.

Obrigado Amanda, mais uma etapa concluída com teu apoio e tua ajuda, sou muito grato pela vida ter colocado a gente no mesmo caminho para caminhar junto e crescer junto.

Aos meus amigos que criei durante meu período em Lages e que nesses últimos dois anos foram ainda mais importantes para mim. Bárbara, mesmo que no momento mais tortuoso a gente esteve distante fisicamente, é impossível pensar passar esse momento sem o teu apoio. Deschamps, obrigado por mais um ciclo juntos em Lages, tu és grande. Leonora, obrigado por me apoiar, me receber em casa e ser tão solícita em me ajudar em todos os momentos.

As pessoas maravilhosas que sempre me acolherem e me fizeram me sentir em casa, tão em casa que inclusive cederam um espaço para me acolher por um período em Lages. Sou eternamente grato a vocês e nunca vou conseguir agradecer por tudo isso. Obrigado Tunico, Alexia e Julia.

Às minhas colegas de mestrado, que tanto entendem esse momento. Foi uma felicidade gigantesca ter vocês comigo, todos os momentos difíceis ficaram mais leves compartilhados com vocês. Obrigado por toda ajuda, por toda dedicação e por todo carinho de não me deixar abalar em diversos momentos. Foi uma honra imensurável ter feito esse trabalho ao lado de vocês Anna, Loirana, Marcela e Roberta. Vocês são demais!

Um agradecimento especial a todos do Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA), laboratório que me recebeu de portas abertas e que faz eu me sentir em casa. A todos do Laboratório de Patologia Animal (LAPA) e a professora dra. Renata Asssis Casagrande pela parceria tão importante neste trabalho e dedicação para que tudo saísse da melhor forma possível. Um agradecimento especial também ao PDVET pelo apoio e acolhimento no grupo.

Ao meu orientador, professor dr. Joandes Henrique Fonteque, por ter me aceitado no programa e ter acreditado no meu potencial desde o início, foi muito importante todo o apoio que eu recebi e todos os conselhos. Ao meu coorientador, professor dr. Ubirajara Maciel da Costa, por ter passado mais essa etapa me auxiliando em tudo e sendo um grande pilar emocional e profissional.

Obrigado aos pesquisadores parceiros que aceitaram de primeira a parceria nessa pesquisa e foram essenciais para que a pesquisa tenha desenvolvido tal importância, obrigado dr. Anja Kipar e dr. Udo Hetzel da Universidade de Zurich e dr. Jussi Hepojoki da Universidade de Helsinki.

Obrigado à Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), instituição que me apoiou durante toda minha graduação e agora esteve ao meu lado em mais essa etapa da minha vida. Sou extremamente grato e nunca vou esquecer de onde eu vim.

Agradecimentos a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC, Nº 48/2022 APOIO À INFRAESTRUTURA PARA GRUPOS DE PESQUISA DA UDESC – No. 2023TR000557) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e UDESC pelo auxílio financeiro no desenvolvimento da pesquisa.

Por fim, obrigado a todos que fizeram parte disso e me apoiaram nesse momento.

“Faço de mim casa de sentimentos bons, onde a má fé não faz morada e a maldade não se cria. Me cerco de boas intenções e amigos de nobres corações que sopram e abrem portões com chave que não se copia”

Forfun

RESUMO

As neoplasias são comuns em serpentes e podem ser predispostas por fator genético, idade, oncogênese viral, hormonal e outros fatores. O hemangiossarcoma é uma neoplasia comumente descrita em cães idosos e raramente descrita em serpentes, principalmente na sua forma cutânea, além disso, nunca foi associada à presença viral. Este estudo tem como objetivo caracterizar o hemangiossarcoma cutâneo e hepático em *Epicrates cenchria* afetadas pela doença do corpúsculo de inclusão e testaram positivo para *Reptarenavirus* por meio da imuno-histoquímica. Foram estudados 13 animais acometidos por hemangiossarcoma cutâneo, sendo 69% de machos e idade média de $14,7 \pm 0,95$ anos, dos quais dois foram necropsiados e possuíam hemangiossarcoma hepático. Esses animais foram selecionados de um plantel no qual todos os indivíduos possuem contato cruzado, embora não apresentem ligação genética completa. Os resultados revelaram uma média de $16,7 \pm 12,4$ nódulos cutâneos por animal, com a região ventral sendo responsável por 69% dos casos. A descrição histopatológica do hemangiossarcoma foi semelhante as demais espécies. Além disso, há suspeita de que o *Reptarenavirus* possa ser o agente predisponente para o desenvolvimento do hemangiossarcoma nesses animais.

Palavras-chave: neoplasia; doença do corpúsculo de inclusão; oncogênese viral; oncologia.

ABSTRACT

Neoplasms are common in snakes and can be predisposed by genetic factors, age, viral oncogenesis, hormonal factors, and other factors. Hemangiosarcoma is a neoplasm commonly described in elderly dogs and rarely reported in snakes, mainly in its cutaneous form, furthermore, it has never been associated with viral presence. This study aims to characterize cutaneous and hepatic hemangiosarcoma in *Epicrates cenchria* affected by inclusion body disease and tested positive for Reptarenavirus through immunohistochemistry. Thirteen animals affected by cutaneous hemangiosarcoma were studied, with 69% being males and a mean age of 14.7 ± 0.95 years, of which two were necropsied and had hepatic hemangiosarcoma. These animals were selected from a population in which all individuals have cross-contact, although they do not have complete genetic linkage. The results revealed an average of 16.7 ± 12.4 cutaneous nodules per animal, with the ventral region accounting for 69% of the cases. The histopathological description of hemangiosarcoma was similar to other species. Additionally, there is suspicion that Reptarenavirus may be the predisposing agent for the development of hemangiosarcoma in these animals.

Keywords: neoplasia; inclusion body disease; viral oncogenesis; oncology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Hemangiossarcoma cutâneo em machos de *Epicrates cenchria*. (A) Máculas avermelhadas multifocal em região ventral de um macho de 16 anos (seta). (B) Nódulo endofítico enegrecido em região ventral de um macho de 16 anos. (C) Dois nódulos endofíticos ulcerados (ponta da seta) e área cicatricial (seta) em região ventral de macho de 14 anos. (D) Nódulo endofítico vermelho escuro de 0,9 cm de diâmetro em região ventral de um macho de 15 anos. (E) Nódulo exofítico avermelhado e área cicatricial (seta) em região ventral de um macho de 16 anos. (F) Áreas cicatriciais (seta) em região ventral de macho de 16 anos. (G) Dois nódulos exofíticos (círculo pontilhado) em região lateral de um macho de 14 anos. (H) Nódulo exofítico (círculo pontilhado) em região dorsal de um macho de 14 anos.....54
- Figura 2 – Fotomicrografia de arranjo histológico dos nódulos cutâneos de hemangiossarcoma em *Epicrates cenchria*. (A) Nódulo composto por áreas sólidas e vasos de pequeno e médio calibre, HE (B) Capilar: Nódulo composto por vasos de pequeno calibre com células neoplásicas fusiformes a alongadas, de núcleo arredondado, central, com cromatina densa e nucléolo pouco evidente, além de citoplasma pouco delimitado e escasso, HE. (C) Área cavernosa: Nódulo composto por vasos de médio calibre, HE (D) Sólido: Nódulo composto por áreas sólidas, HE.56
- Figura 3 - Necropsia de uma fêmea de *Epicrates cenchria* com hemangiossarcoma cutâneo e hepático. (A) Animal em posição ventrodorsal com distribuição difusa de nódulos cutâneos de hemangiossarcoma. (B) Imagem aproximada da porção ventral com nódulos de hemangiossarcoma. Na miniatura, um nódulo cutâneo, ao corte, demonstrando coloração vermelho-escura a esbranquiçada. (C) Acúmulo discreto de líquido serossanguinolento em cavidade celomática. (D) Fígado com nódulos esbranquiçados multifocal a coalescente. (E) Nódulo de 1 cm de diâmetro em região cranial do fígado. (F) Nódulo esbranquiçado (seta) e vermelho-escuro (círculo tracejado) em parênquima hepático (corte transversal). (G e H) Nódulo elevado transmural em estomago, ao corte, esbranquiçado.....59
- Figura 4 – Fotomicrografia histológica de hemangiossarcoma hepático, granuloma hepático e leiomiossarcoma de fêmea de *Epicrates cenchria*. (A) Hemangiossarcoma hepático com vasos de pequeno e médio calibre preenchidos por eritrócitos e trombos, não encapsulado. (B) Fígado com focos de melanomacrófagos e degeneração acentuada, HE. (C) Granuloma hepático com áreas de necrose e mineralização circundadas por heterofilos, linfócitos e plasmócitos e mais internamente por macrófagos e células gigantes multinucleadas, HE. (D) Leiomiossarcoma em estômago, com proliferação celular organizada em feixes multidirecionais, não encapsulado e de estroma fibrovascular escasso, HE.60
- Figura 5 - Necropsia de um macho de *Epicrates cenchria* com hemangiossarcoma cutâneo e hepático. (A) Animal em posição ventrodorsal com distribuição difusa de nódulos cutâneos de hemangiossarcoma. (B) Imagem ampliada da porção ventral com nódulos de hemangiossarcoma. (C) Nódulos avermelhado de aproximadamente 1 cm (círculo pontilhado branco) em fígado. (D) Porção caudal do fígado com nódulos avermelhados (círculo pontilhado branco).61
- Figura 6 - Fotomicrografia histológica e imuno-histoquímica de fígado do macho de *Epicrates cenchria*. (A) Hemangiossarcoma com vasos de pequeno e médio calibre preenchidos por eritrócitos e trombos, não encapsulado. Além de melanomacrófagos multifocal. (B) Trabécula do hemangiossarcoma com corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico (seta), HE. (C) Degeneração hepática com corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico (seta) e infiltrado heterofílico (ponta da seta), HE. (D) Imuno-histoquímica com marcação moderada para *Reptarenavirus* (seta).....63

Figura 7 – Fotomicrografia histológica e imuno-histoquímica de um macho de *Epicrates cenchria* com hemangiossarcoma epitelial e hepático associado com BIBD e marcação positiva pra *Reptarenavírus* na imuno-histoquímica. (A) Em cérebro, corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em corpo neurônios (seta), HE (B e D) IH do cérebro com marcação acentuada (seta). (C) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em corpo neuronal (ponta da seta), HE. (E) Necrose (indicada pelo +) associada a infiltrado inflamatório focalmente extenso e moderado no braço, HE. (F) IH do baço com marcação discreta (seta). (G) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em pâncreas (seta), HE. (H) IH do pâncreas com marcação acentuada (seta).....64

Figura 8 – Fotomicrografia histológica e imuno-histoquímica de um macho de *Epicrates cenchria* com hemangiossarcoma epitelial e hepático associado com BIBD e marcação positiva pra *Reptarenavírus* na imuno-histoquímica. (A) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em túbulos contorcidos proximais do rim (seta) associado a acúmulo de grânulos castanhos (ponta da seta), HE (B) IH do rim com marcação moderada (seta) e acúmulo de grânulos castanhos (ponta da seta). (C) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em adrenal (seta), HE. (D) IH da adrenal com marcação discreta (seta) (E) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em testículo (seta) associado a áreas de degeneração testicular (+) e fibrose (*), HE. (F) IH do testículo com marcação difusa (seta) e acúmulo de grânulos castanhos (ponta da seta). (G) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em epidídimos (seta), HE. (H) IH do epidídimos com marcação acentuada (seta)65

Figura 9 – Fotomicrografia histológica e imuno-histoquímica de um macho de *Epicrates cenchria* com hemangiossarcoma epitelial e hepático associado com BIBD e marcação positiva pra *Reptarenavírus* na imuno-histoquímica. (A) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em esôfago (seta), HE (B) IH do esôfago com marcação acentuada em epitélio (seta). (C) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em estomago (seta), HE. (D) IH da estomago com marcação moderada em camada epitelial e glandular (seta) (E) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em intestino delgado (seta), HE. (F) IH do intestino delgado com marcação discreta em epitélio (seta). (G) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em intestino grosso (seta), HE. (H) IH do intestino grosso com marcação discreta em epitélio (seta).....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estadiamento do hemangiossarcoma em cães com base nas características do tumor primário (T), envolvimento dos linfonodos regionais (N) e presença de metástases a distância (M).....	33
Tabela 2: Estadiamento do hemangiossarcoma cutâneo com base na descrição do local primário com a localização da neoplasia.....	34
Tabela 3 Estadiamento do hemangiossarcoma cutâneo com base na descrição do local primário com a localização da neoplasia.....	49
Tabela 4 - Estadiamento das <i>Epicrates cenchria</i> com relação aos nódulos cutâneos de hemangiossarcoma.....	55
Tabela 5: Imuno-histoquímica para <i>Reptarenavirus</i> realizada nos órgãos com presença de corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico de <i>Epicrates cenchria</i> necropsiadas com hemangiossarcoma. Com relação a intensidade da marcação: + (discreta), ++ (modera), +++) (acentuada), - (negativo) e I (inconclusivo).....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Características topográficas e macroscópicas de nódulos cutâneos de hemangiossarcoma em 10 <i>Epicrates cenchria</i>	51
Quadro 2 - Características histológicas de nódulos cutâneos de hemangiossarcoma em <i>Epicrates cenchria</i>	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Quantidade de nódulos ventrais por animal.	52
Gráfico 2 – Quantidade de nódulos laterais por animal.	52
Gráfico 3 – Quantidade de nódulos dorsais por animal.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIBD	Doença do corpúsculo de inclusão
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
LCMV	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SSP	<i>Structured signal peptide</i>
GP1	Glicoproteína 1
GP2	Glicoproteína 2
mL	Microlitro
HE	Hematoxilina e eosina
IH	Imuno-histoquímica
μ	Média
mm ²	Milímetros cúbicos
cm	Centímetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	28
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	31
4 REFERÊNCIAS	40
5 CARACTERIZAÇÃO ANÁTOMO HISTOPATOLÓGICA DE HEMANGIOSSARCOMA EM <i>EPICRATES CENCHRIA</i> (JIBOIA ARCO-ÍRIS) COM DOENÇA DO CORPUSCULO DE INCLUSÃO	46
5.1 RESUMO	46
5.2 INTRODUÇÃO.....	46
5.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
5.3.1 Autorizações.....	47
5.3.2 Seleção dos animais e acondicionamento	48
5.3.3 Colheita das amostras	48
5.3.4 Caracterização anatomo histopatológica e imunohistoquímica.....	49
5.3.5 Colorações especiais	50
5.3.6 Analise estatística.....	50
5.5 DISCUSSÃO	67
5.6 CONCLUSÃO.....	70
5.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
5.8 REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

A popularização de animais de estimação não convencionais no Brasil está em constante expansão. Dentro desse segmento, os répteis e pequenos mamíferos apresentaram aumento de 4,2% entre 2021 e 2022, enquanto o crescimento do mercado de cães, foi de 3,5% (ABINPET, 2021). Esse aumento pode estar relacionado à lei complementar nº 140 de 8 de dezembro de 2011, que atribui aos estados a competência para aprovar criatórios comerciais de animais silvestres, proporcionando maior flexibilidade para o comércio.

Com o aumento da popularidade e da presença desses animais em residências, também tem ocorrido aumento nos cuidados e na longevidade. Como resultado, o diagnóstico de doenças que antes eram menos comuns, como neoplasias, tornou-se mais frequente. As neoplasias em répteis geralmente apresentam um foco local, e em menor frequência, múltiplos focos neoplásicos ou metástases, normalmente associados a animais geriátricos (FRYE, 1994; SYKES e TRUPKIEWICZ, 2006). Existem poucos relatos de neoplasias associadas à oncogênese viral em serpentes (CLARK *et al.*, 1979; CHANDRA *et al.*, 2001; ORÓS *et al.*, 2004; CHRISTMAN *et al.*, 2017), e não há relatos conhecidos de neoplasias associadas à derivação genética.

Uma neoplasia que ocorre com baixa incidência em serpentes é o hemangiossarcoma, que foi descrito em apenas dois casos na literatura, ambos envolveram a presença de nódulos únicos e viscerais. Um relato descreveu uma lesão no baço de uma *Pantherophis guttatus* (Cobra do milho) adulta de idade não estimada (TUTTLE *et al.*, 2006), enquanto o outro um tumor no coração de uma *Leioheterodon madagascariensis* geriátrica (SHOEMAKER *et al.*, 2016).

Os hemangiossarcomas são neoplasias malignas mesenquimais de origem vascular. Eles podem ocorrer como um único foco ou de forma multifocal, sendo metastáticos em cerca de 80% dos casos no momento do diagnóstico. Esses tumores são pouco circunscritos e normalmente aderem às estruturas adjacentes, sendo frequentemente encontrados em animais geriátricos (KUSEWITT, 2013; FERNANDES e NARDI, 2016).

O hemangiossarcoma pode estar associado à oncogênese viral. Geralmente, os relatos estão relacionados à família *Retroviridae*, embora não haja descrições em répteis, apenas em aves e mamíferos (HEVEZI e GOFF, 1991; MORGAN *et al.*, 2005).

Além disso, a associação entre vírus e neoplasias também foi descrita em serpentes por meio do isolamento de *Reptarenavirus* em tecido de fibromixoma odontogênico em uma jiboia (SIMARD *et al.*, 2020). O *Reptarenavirus* é o agente etiológico da doença do corpúsculo de

inclusão em boídeos (BIBD). Pertencente à família *Arenaviridae*, trata-se de um vírus envelopado com genoma composto por RNA de fita simples, sentido negativo e segmentado (GALLAHER; DISIMONE; BUCHMEIER, 2001; ESCHLI *et al.*, 2006; RADOSHITZKY *et al.*, 2008; BURRI *et al.*, 2012; MAES *et al.*, 2018; DISKIN, 2023). Seu genoma é dividido em segmento S, que codifica os precursores de glicoproteínas e nucleoproteínas, e um segmento maior, denominado L, que codifica a RNA polimerase dependente de RNA viral e a proteína de matriz de zinco (PONTREMOLI *et al.*, 2018).

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo realizar uma caracterização anátomo-histopatológica do hemangiossarcoma cutâneo e hepático em *Epicrates cenchria*. Além disso, foi descrito o desenvolvimento da neoplasia de forma múltipla em animais com contato cruzado e sem ligação genética completa. Também foi investigada uma possível associação com oncogênese viral, por meio da identificação de *Reptarenavirus* nos animais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar anátomo-histopatológicamente o hemangiossarcoma em um grupo de serpentes *Epicrates cenchria* de um plantel, avaliando sua possível correlação a um vírus oncogênico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Descrever a topografia dos nódulos cutâneos de hemangiossarcoma em *Epicrates cenchria*;
- b. Caracterizar macroscopicamente os nódulos de hemangiossarcoma em *Epicrates cenchria*;
- c. Caracterizar histologicamente os nódulos cutâneos e viscerais de hemangiossarcoma em *Epicrates cenchria*;
- d. Estudiar e diferenciar os nódulos de hemangiossarcoma presentes nas *Epicrates cenchria*;
- e. Descrever a presença de vírus oncogênico associado com as lesões de hemangiossarcoma.

3 REVISÃO DE LITERATURA

As neoplasias são caracterizadas pelo crescimento e proliferação anormal da célula (CULLEN; PAGE; MISDORP, 2002). A origem das neoplasias pode estar associada com alguns fatores, como o genético, através de uma alteração oriunda dos genes dos pais; o fator hormonal, através de um desequilíbrio hormonal; o fator geriátrico, através de mutações celulares devido à idade do animal e o fator viral, dado através de um oncogene viral (KUSEWITT, 2013; CHRISTMAN *et al.*, 2017).

As neoplasias são diferenciadas em dois tipos: as benignas, que são bem delimitadas, não invadem o tecido adjacente, as células são bem diferenciadas e em geral não leva o animal a óbito; e as neoplasias malignas, que não são bem delimitadas, invadem o tecido adjacente, podendo causar metástase em outros órgãos, as células são pouco diferenciadas e podem levar o animal a óbito (KUSEWITT, 2013; ZUCARRI *et al.*, 2016).

Em répteis, as neoplasias são relativamente comuns, tendo maior prevalência em serpentes e lagartos do que em quelônios e crocodilianos. Aproximadamente, de 2,9% a 15% das serpentes, são acometidas por alguma neoplasia (GARNER *et al.*, 2004; SYKES e TRUPKIEWICZ, 2006; PAGE-KARJIAN *et al.*, 2017).

O sistema musculoesquelético é o mais afetado por neoplasias em répteis (HERNANDEZ-DIVERS *et al.*, 2003). Além disso, as neoplasias de origem mesenquimal são as que mais acometem serpentes, geralmente afetando o tecido epitelial como forma primária e o fígado como o órgão mais acometido por metástase (PAGE-KARJIAN *et al.*, 2017). As famílias de serpentes mais acometidas por neoplasias são os colubrídeos, seguido dos viperídeos, boídeos e elapídeos (GARNE *et al.*, 2004; DUKE *et al.*, 2022).

A maioria dos casos de neoplasia em répteis são de forma esporádica, sendo poucos os casos de neoplasias múltiplas ou metástases (FRYE, 1994). Um levantamento entre 1901 e 2002 apresentou que 9% das serpentes acometidas por algum tipo de neoplasia apresentaram metástase e 10% apresentaram múltiplos focos neoplásicos (SYKES e TRUPKIEWICZ, 2006). São poucos os casos de neoplasia em répteis onde conseguiu-se provar a etiologia por oncogênese viral, predisposição genética para neoplasias ou ainda desequilíbrios hormonais (CHRISTMAN *et al.*, 2017).

Em relação à etiologia das lesões neoplásicas em répteis e sua correlação à agentes virais, a associação de *herpesvírus* com fibropapilomatose foi descrita em *Chelonia mydas* (Tartaruga-verde) (LACKOVICH *et al.*, 1999), entre *retrovirus* tipo-C e rabdomiossarcoma descrita em *Pantherophis guttatus* (Cobra-domilho) (CLARK *et al.*, 1979), *Retrovirus* e

linfossarcoma, adenocarcinoma de cólon, carcinoma de células transitórias em rim direito e fibrossarcoma intermandibular em *Python molurus bivittatus* (Píton diamante) (CHANDRA *et al.*, 2001). Partículas de retrovírus tipo-A também foram encontradas em *Corallus caninus* (Cobra-papagaio) em um adenocarcinoma intestinal com metástase em fígado, rins, pulmão e parede celomática (OROS *et al.*, 2004).

O hemangiossarcoma é raro em serpentes, descrito apenas duas vezes, se comportando como uma neoplasia de foco único e com a ausência de associação com fator viral. Foi descrito um nódulo único de hemangiossarcoma esplênico em *Pantherophis guttatus* adulta com quadro de anorexia e a serpente foi a óbito um mês e meio após a cirurgia (TUTTLE *et al.*, 2006), e, uma massa sólida e única na parede do ventrículo de uma *Leioheterodon madagascariensis* de 23 anos que preenchia aproximadamente metade da luz ventricular. No exame histopatológico foi observado que a massa era mal delimitada, não encapsulada e altamente vascularizada com proliferação de vasos sanguíneos não uniformes, o diagnóstico foi confirmado com imuno-histoquímica utilizando o fator VIII (SHOEMAKER *et al.*, 2016).

Os hemangiossarcomas, são neoplasias malignas mesenquimais de origem vascular e que são encontrados em foco único ou multifocal e com metástase em 80% dos casos no momento do diagnóstico, caracterizando-se como uma neoplasia de metástase precoce e agressiva, podendo ser estadeado (Tabela 1). Em animais com múltiplos nódulos é difícil definir o local primário do tumor (OWEN, 1980; HARGIS *et al.*, 1992; SMITH, 2003; KUSEWITT, 2013; FERNANDES e NARDI, 2016). As metástases ocorrem principalmente por via hematógena e, por ser de origem endotelial, a disseminação de células neoplásicas de forma sistêmica é facilitada (SORENMO *et al.*, 2000; FERNANDES e NARDI, 2016).

Os hemangiossarcomas são descritos principalmente em cães geriátricos, com idade entre 8 e 13 anos, machos, sendo expresso com maior frequência na forma visceral. Quando descrito na forma cutânea, pode estar associado com exposição prolongada ao sol (HARGIS *et al.*, 1992; CLIFFORD; MACKIN; HENRY, 2000; SMITH, 2003; KUSEWITT, 2013; FERNANDES e NARDI, 2016). Além disso, é descrito uma pré-disposição genética de algumas raças, como: Golden Retriever, Boxer, Labrador Retriever, Dogue Alemão, Poodle, Husky Siberiano, Setter Inglês, Pointer e Pastor Alemão além de outras raças de porte grande ou animais com pele pouco pigmentada (HARGIS *et al.*, 1992; WARD *et al.*, 1994; CLIFFORD *et al.*, 2001; SMITH, 2003; SZIVEK *et al.*, 2012; KURILJ *et al.*, 2021).

Tabela 1: Estadiamento do hemangiossarcoma em cães com base nas características do tumor primário (T), envolvimento dos linfonodos regionais (N) e presença de metástases a distância (M).

Tumor primário (T)	Linfonodos regionais (N)	Metástases distantes (M)	Estágio
T0 (ausência de evidência do tumor)	N0 (ausência de envolvimento de linfonodos)	M0 (ausência de metástase)	I
T1 (tumor < 5 cm e confinado ao local primário)	N0 (ausência de envolvimento de linfonodos)	M0 (ausência de metástase)	I
T1 (tumor < 5 cm e confinado ao local primário)	N1 (envolvimento de linfonodo regional)	M0 (ausência de metástase)	II
T2 (tumor \geq 5 cm ou ulcerado e invasão do subcutâneo)	N0 (ausência de envolvimento de linfonodos)	M0 (ausência de metástase)	II
T2 (tumor \geq 5 cm ou ulcerado e invasão do subcutâneo)	N1 (envolvimento de linfonodo regional)	M0 (ausência de metástase)	II
T2 (tumor \geq 5 cm ou ulcerado e invasão do subcutâneo)	N0 (ausência de envolvimento de linfonodos)	M1 (presença de metástase)	III
T2 (tumor \geq 5 cm ou ulcerado e invasão do subcutâneo)	N1 (envolvimento de linfonodo regional) ou N2 (envolvimento de linfonodo distante à neoplasia)	M1 (presença de metástase)	III
T3 (invasão de estruturas adjacentes e musculatura)	N0 (ausência de envolvimento de linfonodos)	M0 (ausência de metástase)	III
T3 (invasão de estruturas adjacentes e musculatura)	N1 (envolvimento de linfonodo regional) ou N2 (envolvimento de linfonodo distante à neoplasia)	M0 (ausência de metástase)	III

Fonte: adaptado de Owen, 1980 e Fernandes e Nardi, 2016. Elaborada pelo autor, 2023.

Hemangiossarcoma também está descrito em outras espécies como *Atelerix albiventris* (Hedgehog) (FINKELSTEIN *et al.*, 2008), *Petaurus breviceps* (Petauro-do-açúcar) (RIVAS; PYE; PAPENDICK, 2014), *Equus caballus* (Cavalo doméstico) (SOUTHWOOD *et al.*, 2000; SMITH, 2003), *Cavia porcellus* (Porquinho da Índia) (PAOLETTI *et al.*, 2023), *Turdus rufiventris* (Sabia laranjeira) (LIMA *et al.*, 2016), sendo que, em nenhuma dessas espécies foi observado envolvimento viral.

Como a quantidade de descrições de hemangiossarcomas em répteis é rara na literatura, outras espécies, principalmente cães, são utilizados como modelo descritivo da doença.

Em estudo retrospectivo, de 1912 casos de hemangiossarcoma observou-se que 68% dos casos foram na forma visceral e 32% não visceral. Dos 1912 animais, 95% eram cães, 3% gatos e 2% entre cavalos, ferrets, coelhos, ratos, cabras e vacas (SCHULTHEISS, 2004).

O hemangiossarcoma cutâneo é mais incomum em relação ao visceral, porém, quando descrito é encontrado normalmente em derme, podendo se estender até o subcutâneo e o tecido muscular. É observado com maior frequência em região ventroabdominal, prepúcio e membros pélvicos (OWEN, 1980; HARGIS *et al.*, 1992; CLIFFORD; MACKIN; HENRY, 2000;). Comumente são descritos como hemorrágicos e com possibilidade de necrose (GEARHART; STEFICEK; PETERSEN-JONES, 2007; FILHO *et al.*, 2018). A correlação entre a presença de hemangiossarcoma cutâneo com hemangiossarcoma visceral é expressiva, porém, com dificuldade de definir o local primário da neoplasia (CULBERTSON, 1982; HARGIS *et al.*, 1992). O estadiamento dos nódulos cutâneos também pode ser realizado (Tabela 2).

Tabela 2: Estadiamento do hemangiossarcoma cutâneo com base na descrição do local primário com a localização da neoplasia.

Estágio	Descrição	Localização
I	Tumor primário confinado apenas à derme.	Normalmente região ventral abdominal ou prepucial.
II	Tumor primário envolvendo a hipoderme, com ou sem envolvimento concomitante da derme e sem envolvimento muscular.	Nenhum lugar específico.
III	Qualquer tumor primário com envolvimento muscular.	Nenhum lugar específico.

Fonte: adaptado de Owen, 1980 e Fernandes e Nardi, 2016. Elaborada pelo autor, 2023.

Ward *et al.*, (1994) avaliaram e estadearam 25 cães com hemangiossarcoma cutâneo (Tabela 2). Desses, 40% dos animais foram classificados como estágio I, 40% como estágio II e 20% como estágio III. Em 18 animais a neoplasia se apresentava de forma única, nos 7 animais onde o hemangiossarcoma se apresentava de forma múltipla, estavam limitados em uma região. Foi observado metástase em 3 animais (30%) do estágio I após a excisão cirúrgica, 1 animal (10%) do estágio II e 3 animais (60%) do estágio III. O tempo médio de sobrevida após a retirada do tumor dos animais classificados como estágio I foi de 780 dias e não foi possível provar que esses animais foram a óbito devido ao hemangiossarcoma. Os animais do estágio II tiveram o tempo médio de sobrevida de 172 dias e desses, 3/10

morreram de forma desconhecida e 3/10 devido ao hemangiossarcoma. Já os animais do estágio III, o tempo médio de sobrevida foi de 307 dias e 2/5 morreram de forma desconhecida e 3/5 morreram devido ao hemangiossarcoma.

Szivek *et al.*, (2012) avaliaram 94 cães com hemangiossarcoma cutâneo e 71% apresentavam nódulos únicos e 29% múltiplos nódulos. Foi observado que a recorrência ocorreu em 77% dos cães submetidos à retirada cirúrgica do hemangiossarcoma, sendo restrita apenas próxima ao local da remoção. Apenas 53 cães tiveram biópsias disponíveis, desses, 51% a neoplasia envolvia apenas a derme e 49% envolviam demais tecidos. Ainda, 32 cães apresentaram metástase em uma média de 326 dias. Desses animais, 20 desenvolveram em órgãos abdominais, 12 desenvolveram em pulmão, 3 em tecido oral ou nasal, 4 em ossos, 4 em coração e 4 em sistema nervoso central. O tempo de sobrevida dos animais não foi alterado significativamente com o envolvimento dos tecidos, mas foi observado que animais com subcutâneo e musculatura envolvida tiveram duas vezes mais chance de desenvolver metástase.

O resultado anterior também foi observado por Nobrega *et al.*, (2019), em que a média de sobrevivência não teve diferença significativa entre os estágios I, II e III (17,6 meses, 18 meses e 20,3 meses respectivamente).

Quando o hemangiossarcoma é visceral, é encontrado com maior frequência em baço, átrio direito e fígado (SABATTINI; BETTINI, 2009; BATSCHINSKI *et al.*, 2018; KURILJ *et al.*, 2021), porém, também são descritos em outros locais como omento (SABATTINI; BETTINI, 2009), aorta (GUINAN *et al.*, 2012), cérebro, mesentério (SMITH, 2003), pulmão e rim (SMITH, 2003; KURILJ *et al.*, 2021) sendo esses também os locais de metástase mais frequentes (KUSEWITT, 2013; FERNANDES e NARDI, 2016; BATSCHINSKI *et al.*, 2018).

Em um estudo em que foi realizado o estadiamento de 37 cães com hemangiossarcoma visceral, 67,6% foram classificados como estágio I, 16,2% como estágio II e 16,2% como estágio III. O tempo médio de sobrevida dos animais após a remoção da neoplasia foi de 196 dias para animais do estágio I, 117 dias para animais do estágio II e 23 dias para animais do estágio III. (BATSCHINSKI *et al.*, 2018)

Macroscopicamente o hemangiossarcoma é visto principalmente na forma de nódulos, mas já foram descritas na forma de massa, pápulas ou máculas. São pouco circunscritos e normalmente aderidos às estruturas adjacentes. Os nódulos apresentam dimensões de variados tamanhos, podendo ser focal, multifocal ou coalescente (WARD *et al.*, 1994; SMITH, 2003; FLORES *et al.*, 2012; KUSEWITT, 2013; FERNANDES e

NARDI, 2016). Quando há a ruptura dos nódulos de hemangiossarcoma é comum fluir sangue e observar a presença de coágulos. (FLORES *et al.*, 2012 ; FERNANDES e NARDI, 2016). O rompimento espontâneo dos nódulos pode levar o animal a anemia, hemoperitonio, choque hipovolêmico e óbito (AUTRY; WEITZNER, 1975; SIMANSKY *et al.*, 1986; LANG, 2020).

Com relação a avaliação macroscópica do hemangiossarcoma, são de coloração homogênea vermelho-escuro; vermelho; enegrecidos; marrom; azulado; amarelo e brancos, podendo também se apresentar de forma heterogênea, variando de vermelho-escuro a esbranquiçado. Quanto a consistência, podem ser firmes, friáveis, macios ou císticos ao corte. Pode se apresentar como exofítico, endofítico ou máculas e apresenta uma superfície brilhante, lisa, alopécica e por vezes ulcerado (WARD *et al.*, 1994; CLIFFORD *et al.*, 2001; SMITH, 2003; FLORES *et al.*, 2012; SZIVEK *et al.*, 2012; KUSEWITT, 2013).

Em um estudo que correlacionou nódulos e massas hepáticas em cães com neoplasias, Clendaniel *et al.*, (2014) mostraram que múltiplas lesões hepáticas de tonalidade escuras, abrangendo tons que variam do preto ao verde e ao marrom, exibiram uma sensibilidade e especificidade de 85%, além de uma probabilidade de 86% de serem metástase hepática de hemangiossarcoma. Além disso, quando essas lesões apresentam sangramento voluntário, a especificidade aumentou para 100%.

Conforme o arranjo celular na microscopia ótica é possível classificar o hemangiossarcoma como: capilar, sendo composto por canais vasculares irregulares; predominantemente capilar com parte cavernosa ou sólida, contendo pequenas partes cavernosas ou sólidas; cavernoso, composto por canais vasculares maiores; predominantemente cavernoso com parte capilar ou sólida; sólidos, apresentando perda dos canais vasculares e predominantemente sólidos com partes capilares ou cavernosas (GÖRITZ *et al.*, 2013).

Microscopicamente, o hemangiossarcoma é composto por células neoplásicas fusiformes a epiteloides, organizadas em cordões, trabéculas ou canais vasculares irregulares preenchidos por sangue e trombos (SHOEMAKER *et al.*, 2016; NÓBREGA *et al.*, 2019; BEAUMIER *et al.*, 2020). As células variam em forma, desde achatadas até com citoplasma abundante, fusiformes a poliédricas, e apresentam citoplasma escasso a abundante, anfófílico a eosinofílico. Os núcleos são grandes, ovais a fusiformes, com cromatina frouxa e nucléolos variando de inconsícuos a evidentes e entre um e duplo (SHOEMAKER *et al.*, 2016; NÓBREGA *et al.*, 2019).

Além disso, a neoplasia exibe invasão local, infiltrando-se entre os feixes musculares e criando grandes espaços vasculares preenchidos por sangue (BEAUMIER *et al.*, 2020). Também, é observada a presença de desmoplasia e estroma fibroso (FLORES *et al.*, 2012; NÓBREGA *et al.*, 2019); mitoses em quantidade varia (NÓBREGA *et al.*, 2019) e colágeno intercalado entre as células neoplásicas (FLORES *et al.*, 2012).

Através da avaliação histopatológica, é possível classificar o grau de diferenciação da neoplasia. Tumores com anisocariose discreta e canais vasculares preservados, são classificados como bem diferenciados; tumores com no mínimo 50% dos canais vasculares bem definidos e anisocariose moderada são considerados moderadamente diferenciados, já tumores sólidos, com canais vasculares não preservados e elevada anisocariose, são considerados como pouco diferenciados (SABATTINI; BETTINI, 2009).

O diagnóstico do hemangiossarcoma é confirmado por meio de biópsia incisional e excisional e exame histopatológico (FERNANDES e NARDI, 2016). Quando a lesão não é muito característica no exame histopatológico, pode ser realizado a imuno-histoquímica da lesão (YONEMARU *et al.*, 2007; CHOORAPOIKAYIL *et al.*, 2012; GIUFFRIDA; BACON; KAMSTOCK, 2017).

Com relação ao desenvolvimento do hemangiossarcoma, no caso específico da oncogênese viral, alguns *Retrovirus*, através do gene *v-src*, têm a capacidade de induzir o desenvolvimento de hemangiossarcoma em mamíferos e aves, entretanto com ausência de descrição em répteis (HEVEZIT; GOFF, 1991; MORGAN; MAJORS; GALILEO, 2005).

Recentemente uma jiboia com presença da Doença do Corpúsculo de Inclusão em Boideos (BIBD) e positiva para *Reptarenavirus* em teste de RT-PCR desenvolveu linfoma de cólon três anos após a confirmação de estar infectada pelo vírus. Outra jiboia com presença de BIBD desenvolveu fibromixoma odontogênico após cinco anos da confirmação de estar infectada pelo vírus, nesse caso, foi detectado *Reptarenavirus* no sangue, bem como em tecido hepático e neoplásico (SIMARD *et al.*, 2020).

Schilliger *et al.*, (2015) receberam uma *Boa constrictor imperator* macho de 6 anos de idade e realizaram a citologia de uma massa cranial ao coração. A citologia foi conclusiva para linfoma linfoblástico, e, foi observada a presença de BIBD em células neoplásicas e sanguíneas, confirmando pela primeira vez uma neoplasia associada à BIBD. Nesse caso, não foi confirmada a presença de *Reptarenavirus*.

O *Reptarenavirus* é um vírus pertencente à família *Arenaviridae* (MAES *et al.*, 2018). Essa família foi descrita pela primeira vez em 1933, através do isolamento do vírus *Lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV) (ARMSTRONG; LILLIE, 1934).

O termo "arenavírus" deriva do latim, em que "arena" significa arenoso. Esse nome é atribuído devido à presença de ribossomos sequestrados das células hospedeiras, conferindo ao vírus uma aparência granulosa (CARTER; BISWAL; RAWLS, 1973; RAWLS; BUCHMEIER, 1975). Os arenavírus são caracterizados por serem vírus envelopados, com genoma composto por RNA de fita simples, sentido negativo ou ambisenso e segmentado. No envelope viral, estão presentes glicoproteínas, divididas em: "structured signal peptide" (SSP), responsável pela maturação do precursor de glicoproteínas e processo de fusão da membrana viral (ausente nos *Reptarenavirus*); glicoproteína (GP1), responsável principalmente pelo reconhecimento da célula-alvo e ligação ao receptor de superfície; e glicoproteína 2 (GP2), responsável pela fusão do vírus com a membrana celular (GALLAHER; DISIMONE; BUCHMEIER, 2001; ESCHLI *et al.*, 2006; RADOSHITZKY *et al.*, 2008; BURRI *et al.*, 2012; HEPOJOKI *et al.*, 2018; DISKIN, 2023)

Até 2012, os arenavírus eram descritos principalmente em mamíferos, sendo conhecidos principalmente por causar febre hemorrágica em humanos. Posteriormente, começou a ser descrita a presença de arenavírus em outras classes de animais. Atualmente, os arenavírus são divididos em quatro gêneros: *Antennavirus*, *Hartmanivirus*, *Mammarenavirus* e *Reptarenavirus* (MAES *et al.*, 2018).

O gênero *Mammarenavirus* está restrito a mamíferos e é dividido em dois grupos: o grupo do Velho Mundo e o grupo do Novo Mundo (CHARREL; DE LAMBALLERIE; EMONET, 2008). Nesse gênero, estão os arenavírus responsáveis por causar a Febre Hemorrágica em humanos. No grupo do Novo Mundo, os principais causadores dessa doença são: Vírus Sabiá (Brasil) (ELLWANGER; CHIES, 2017), Vírus Junin (Argentina) (MILLS *et al.*, 1992), Vírus Machupo e Chapare (Bolívia) (GRIFFITHS; WILSON; CLEGG, 1992; DELGADO *et al.*, 2008) e Vírus Guanarito (Venezuela) (WEAVER *et al.*, 2000).

O gênero *Reptarenavirus* é descrito em serpentes, principalmente em boídeos, e é conhecido por causar a BIBD (HEPOJOKI *et al.*, 2015; HYNDMAN *et al.*, 2019). Esse vírus possui um genoma composto por dois segmentos: um segmento menor, denominado S, que codifica os precursores de glicoproteínas e nucleoproteínas, e um segmento maior, denominado L, que codifica a RNA polimerase dependente de RNA viral e a proteína de matriz de zinco (PONTREMOLI *et al.*, 2018).

A BIBD foi observada pela primeira vez na década de 1970, causando a morte de jibóias e pítons nos Estados Unidos, Europa e África (SCHUMACHER *et al.*, 1994). O

nome da doença é derivado da presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos formados por uma proteína de 68 kpb (WOZNIAK *et al.*, 2000). Até a década de 2010, a identificação dessas inclusões era o método de diagnóstico da doença, antes de se descobrir o agente causador. Nos últimos 13 anos, diversos grupos identificaram a presença de *Reptarenavirus* em animais portadores da BIBD, confirmando sua relação como agente causador (HETZEL *et al.*, 2013, 2021; HEPOJOKI *et al.*, 2015; STENGLINEIN *et al.*, 2017; SIMARD *et al.*, 2020).

Hepojoki *et al.* (2015), observaram que animais com BIBD estavam frequentemente co-infectados com mais de uma espécie de *Reptarenavirus*, levando à conclusão de que a co-infecção ou superinfecção viral pode ser essencial para o desenvolvimento de imunossupressão nos animais e o surgimento dos sintomas clínicos.

Os animais afetados pela BIBD podem apresentar sinais neurológicos, como opistótono, tremores, desequilíbrio e incapacidade de sustentar seu próprio peso, além de regurgitação, anorexia e outros sintomas inespecíficos. Em alguns casos, podem permanecer assintomáticos por longos períodos (HETZEL *et al.*, 2013, 2021; HYNDMAN *et al.*, 2019).

Atualmente, o diagnóstico da BIBD é realizado pela presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos, sendo confirmada a presença do *Reptarenavirus* por meio de técnicas como RT-PCR, sequenciamento de nova geração e imuno-histoquímica (STENGLINEIN *et al.*, 2012; HETZEL *et al.*, 2013, 2021; HEPOJOKI *et al.*, 2015; SIMARD *et al.*, 2020;).

4 REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, Charles; LILLIE, R. D. Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. **Public Health Reports (1896-1970)**, p. 1019-1027, 1934.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO - ABINPET (São Paulo). **Mercado Pet no Brasil**: 2021. Disponível em: <https://abinpet.org.br/dados-de-mercado/>. Acesso em: 27 junho. 2023
- AUTRY, Johnna Russell; WEITZNER, Stanley. Hemangiosarcoma of spleen with spontaneous rupture. **Cancer**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 534–539, 1975.
- BATSCHINSKI, Karen *et al.* Canine visceral hemangiosarcoma treated with surgery alone or surgery and doxorubicin: 37 cases (2005–2014). **The Canadian Veterinary Journal**, v. 59, n. 9, p. 967, 2018.
- BEAUMIER, Amelie *et al.* Primary cardiac hemangiosarcoma in a horse: echocardiographic and necropsy findings. **Journal of Veterinary Cardiology**, [s. l.], v. 32, p. 66–72, 2020.
- BURRI, Dominique J. *et al.* Envelope glycoprotein of arenaviruses. **Viruses**, v. 4, n. 10, p. 2162-2181, 2012.
- CARTER, Michael F.; BISWAL, Nilambar; RAWLS, William E. Characterization of nucleic acid of Pichinde virus. **Journal of Virology**, v. 11, n. 1, p. 61-68, 1973.
- CHANDRA, A. M. S.; JACOBSON, E. R.; MUNN, R. J. Retroviral particles in neoplasms of Burmese pythons (*Python molurus bivittatus*). **Veterinary Pathology**, v. 38, n. 5, p. 561-564, 2001.
- CHARREL, Rémi N.; DE LAMBALLERIE, Xavier; EMONET, Sébastien. Phylogeny of the genus Arenavirus. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 4, p. 362-368, 2008.
- CHOORAPOIKAYIL, Suma *et al.* Haploinsufficiency of the genes encoding the tumor suppressor Pten predisposes zebrafish to hemangiosarcoma. **DMM Disease Models and Mechanisms**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 241–247, 2012.
- CHRISTMAN, Jane *et al.* Oncology of reptiles: diseases, diagnosis, and treatment. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 87-110, 2017.
- CLARK, H. F.; ANDERSEN, P. R.; LUNGER, P. D. Propagation and characterization of a C-type virus from a rhabdomyosarcoma of a corn snake. **Journal of General Virology**, v. 43, n. 3, p. 673-683, 1979.
- CLENDANIEL, Daphne C. *et al.* Association between macroscopic appearance of liver lesions and liver histology in dogs with splenic hemangiosarcoma: 79 cases (2004-2009). **Journal of the American Animal Hospital Association**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. e6–e6, 2014.
- CLIFFORD, Craig A. *et al.* Plasma vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs and dogs with hemangiosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 131–135, 2001.

- CLIFFORD, Craig A.; MACKIN, Andrew J.; HENRY, Carolyn J. Treatment of canine hemangiosarcoma: 2000 and beyond. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 5, p. 479-485, 2000.
- CULBERTSON JR, M. R. Hemangiosarcoma of the canine skin and tongue. **Veterinary Pathology**, v. 19, n. 5, p. 556-558, 1982.
- CULLEN, J. M.; PAGE, R.; MISDORP, W. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis, and management. **Tumors in domestic animals**, [s. l.], p. 3-44, 2002.
- DELGADO, Simon *et al.* Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 4, n. 4, 2008.
- DISKIN, Ron. A structural perspective on the evolution of viral/cellular macromolecular complexes within the arenaviridae family of viruses. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 79, p. 102561, 2023.
- DUKE, E. G. *et al.* A Multi-Institutional Collaboration to Understand Neoplasia, Treatment and Survival of Snakes. **Animals**, v. 12, n. 3, p. 258, 2022.
- ELLWANGER, Joel Henrique; CHIES, José Artur Bogo. Keeping track of hidden dangers-The short history of the Sabiá virus. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, p. 03-08, 2017.
- ESCHLI, Bruno *et al.* Identification of an N-Terminal Trimeric Coiled-Coil Core within Arenavirus Glycoprotein 2 Permits Assignment to Class I Viral Fusion Proteins. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 80, n. 12, p. 5897-5907, 2006.
- FERNANDES, S. C.; NARDI, A. B. De. Hemangiossarcomas. In: DALECK, C. R.; NARDI, A. B. De. **Oncologia em cães e gatos**. 2. ed. rev. [S. l.]: Roca, 2016. cap. 42, p. 776-796.
- FILHO, Antônio F. Leis *et al.* Primary diffuse mammary hemangiosarcoma in a female dog. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 102-107, 2018.
- FINKELSTEIN, Ariana *et al.* Cutaneous Epithelioid Variant Hemangiosarcoma in a Captive African Hedgehog (*Atelerix albiventris*). **Journal of Exotic Pet Medicine**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 49-53, 2008.
- FLORES, Mariana M. *et al.* Aspectos epidemiológicos e anatomo-patológicos do hemangiossarcoma em cães: 40 casos (1965-2012). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 1319-1328, 2012.
- FRYE, F. L. Diagnosis and surgical treatment of reptilian neoplasms with a compilation of cases 1966-1993. **In Vivo (Athens, Greece)**, v. 8, n. 5, p. 885-892, 1994.
- GALLAHER, William R.; DISIMONE, Christopher; BUCHMEIER, Michael J. The viral transmembrane superfamily: possible divergence of Arenavirus and Filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor. **BMC microbiology**, v. 1, p. 1-6, 2001.
- GARNER, M. M.; HERNANDEZ-DIVERS, S. M.; RAYMOND, J. T. Reptile neoplasia: a retrospective study of case submissions to a specialty diagnostic service. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 7, n. 3, p. 653-671, 2004.

- GEARHART, Patricia M.; STEFICEK, Barbara A.; PETERSEN-JONES, Simon M. Hemangiosarcoma and squamous cell carcinoma in the third eyelid of a horse. **Veterinary ophthalmology**, v. 10, n. 2, p. 121-126, 2007.
- GIUFFRIDA, M. A.; BACON, N. J.; KAMSTOCK, D. A. Use of routine histopathology and factor VIII-related antigen/von Willebrand factor immunohistochemistry to differentiate primary hemangiosarcoma of bone from telangiectatic osteosarcoma in 54 dogs. **Veterinary and Comparative Oncology**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 1232–1239, 2017.
- GÖRITZ, M. *et al.* Canine splenic haemangiosarcoma: Influence of metastases, chemotherapy and growth pattern on post-splenectomy survival and expression of angiogenic factors. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 149, n. 1, p. 30–39, 2013.
- GRIFFITHS, C. M.; WILSON, S. M.; CLEGG, J. C. S. Sequence of the nucleocapsid protein gene of Machupo virus: close relationship with another South American pathogenic arenavirus, Junin. **Archives of virology**, v. 124, p. 371-377, 1992.
- GUINAN, Justin *et al.* Primary peri-aortic hemangiosarcoma in a dog. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 53, n. 11, p. 1214, 2012.
- HARGIS, A. M. *et al.* A retrospective clinicopathologic study of 212 dogs with cutaneous hemangiomas and hemangiosarcomas. **Veterinary Pathology**, v. 29, n. 4, p. 316-328, 1992.
- HEPOJOKI, J. *et al.* Arenavirus Coinfections Are Common in Snakes with Boid Inclusion Body Disease. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 89, n. 16, p. 8657–8660, 2015.
- HEPOJOKI, Jussi *et al.* Characterization of Haartman Institute snake virus-1 (HISV-1) and HISV-like viruses—The representatives of genus Hartmanivirus, family Arenaviridae. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 14, n. 11, 2018.
- HERNANDEZ-DIVERS, S. M.; GARNER, M. M. Neoplasia of reptiles with an emphasis on lizards. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 6, n. 1, p. 251-273, 2003.
- HETZEL, U. *et al.* Experimental Reptarenavirus Infection of Boa constrictor and Python regius. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 95, n. 7, 2021.
- HETZEL, Udo *et al.* Isolation, Identification, and Characterization of Novel Arenaviruses, the Etiological Agents of Boid Inclusion Body Disease. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 87, n. 20, p. 10918–10935, 2013.
- HEVEZI, PETER; GOFF, STEPHEN P. Generation of recombinant murine retroviral genomes containing the v-src oncogene: Isolation of a virus inducing hemangiosarcomas in the brain. **Journal of virology**, v. 65, n. 10, p. 5333-5341, 1991.
- HYNDMAN, T. H. *et al.* Reptarenaviruses in apparently healthy snakes in an Australian zoological collection. **Australian Veterinary Journal**, [s. l.], v. 97, n. 4, p. 93–102, 2019.
- KURILJ, Andrea Gudan *et al.* Pathomorphological features and mast cell count in canine visceral hemangiosarcomas. **Veterinarski Arhiv**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 159–168, 2021.
- KUSEWITT, D. F. Neoplasia e Biologia Tumoral. In: MCGAVIN, M. Donald *et al.* **Bases da patologia em veterinária**. 5. ed. [S. l.]: Elsevier Editora Ltda, 2013. cap. 6, p. 733-813.

- LACKOVICH, J. K. *et al.* Association of herpesvirus with fibropapillomatosis of the green turtle *Chelonia mydas* and the loggerhead turtle *Caretta caretta* in Florida. **Diseases of aquatic organisms**, v. 37, n. 2, p. 89-97, 1999.
- LANG, Brittany. Student Paper Communication étudiante. **A lasting legacy**, v. 61, p. 1203-1205, 2020.
- LIMA, Rosolem *et al.* Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 44, p. 1-5, 2016.
- MAES, Piet *et al.* Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 163, n. 8, p. 2295-2310, 2018.
- MILLS, J. N. *et al.* A longitudinal study of Junin virus activity in the rodent reservoir of Argentine hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 47, n. 6, p. 749-763, 1992.
- MORGAN, John C.; MAJORS, John E.; GALILEO, Deni S. Distinct and opposite roles for SH2 and SH3 domains of v-src in embryo survival and hemangiosarcoma formation. **Clinical and Experimental Metastasis**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 167-175, 2005.
- NÓBREGA, D. F. *et al.* Canine Cutaneous Haemangiosarcoma: Biomarkers and Survival. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 166, p. 87-96, 2019.
- OROS, J. *et al.* Type A-like retroviral particles in a metastatic intestinal adenocarcinoma in an emerald tree boa (*Corallus caninus*). **Veterinary pathology**, v. 41, n. 5, p. 515-518, 2004.
- OWEN, Laurence Nightingale *et al.* **TNM Classification of Tumours in Domestic Animals/edited by LN Owen**. World Health Organization, 1980.
- PAGE-KARJIAN, A. *et al.* Neoplasia in snakes at Zoo Atlanta during 1992– 2012. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 48, n. 2, p. 521-524, 2017.
- PAOLETTI, Carlo *et al.* Spontaneous splenic hemangiosarcoma in pet guinea pigs (*Cavia porcellus*): five cases (2007–2021). **Journal of Exotic Pet Medicine**, [s. l.], v. 44, p. 36-45, 2023.
- PONTREMOLI, Chiara *et al.* Analysis of Reptarenavirus genomes indicates different selective forces acting on the S and L segments and recent expansion of common genotypes. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 64, p. 212-218, 2018.
- PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA CASA CIVIL. **Lei complementar nº 140, de 8 de dezembro de 2011**. 1. [S. l.], 8 dez. 2011.
- RADOSHITZKY, Sheli R *et al.* **Receptor determinants of zoonotic transmission of New World hemorrhagic fever arenaviruses**. [S. l.: s. n.], 2008.
- RAWLS, William E; BUCHMEIER, Michael. **Arenaviruses: purification and physicochemical nature** *. [S. l.: s. n.], 1975.

- RIVAS, Anne E.; PYE, Geoffrey W.; PAPENDICK, Rebecca. Dermal Hemangiosarcoma in a Sugar Glider (*Petaurus breviceps*). **Journal of Exotic Pet Medicine**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 384–388, 2014.
- SABATTINI, S.; BETTINI, G. An Immunohistochemical Analysis of Canine Haemangioma and Haemangiosarcoma. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 140, n. 2–3, p. 158–168, 2009.
- SCHILLIGER, Lionel *et al.* Antemortem Diagnosis of Multicentric Lymphoblastic Lymphoma, Lymphoid Leukemia, and Inclusion Body Disease in a Boa Constrictor (*Boa constrictor imperator*). **Journal of Herpetological Medicine and Surgery**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 11, 2015.
- SCHULTHEISS, Patricia C. A retrospective study of visceral and nonvisceral hemangiosarcoma and hemangiomas in domestic animals. **Journal of Veterinary diagnostic investigation**, v. 16, n. 6, p. 522-526, 2004.
- SCHUMACHER, Juergen *et al.* Inclusion body disease in boid snakes. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, p. 511-524, 1994.
- SHOEMAKER, Margaret *et al.* Pathology in practice. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 248, n. 2, p. 153-155, 2016.
- SIMANSKY, David A. *et al.* Rapid progressive dissemination of hemangiosarcoma of the spleen following spontaneous rupture. **World journal of surgery**, v. 10, p. 142-144, 1986.
- SIMARD, Jules *et al.* Prevalence of inclusion body disease and associated comorbidity in captive collections of boid and pythonid snakes in Belgium. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 3, 2020.
- SMITH, Annette N. Hemangiosarcoma in dogs and cats. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 533-552, 2003.
- SORENMO, K. *et al.* Canine hemangiosarcoma treated with standard chemotherapy and minocycline. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 395–398, 2000.
- SOUTHWOOD, Louise L. *et al.* Disseminated hemangiosarcoma in the horse: 35 cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 1, p. 105-109, 2000.
- STENGLEIN, Mark D. *et al.* Differential Disease Susceptibilities in Experimentally Reptarenavirus-Infected Boa Constrictors and Ball Pythons. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 91, n. 15, 2017.
- STENGLEIN, Mark D. *et al.* Identification, characterization, and in vitro culture of highly divergent arenaviruses from boa constrictors and annulated tree boas: Candidate etiological agents for snake inclusion body disease. **mBio**, [s. l.], v. 3, n. 4, 2012.
- SYKES, J. M.; TRUPKIEWICZ, J. G. Reptile neoplasia at the Philadelphia zoological garden, 1901–2002. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 37, n. 1, p. 11-19, 2006.

- SZIVEK, A. *et al.* Clinical outcome in 94 cases of dermal haemangiosarcoma in dogs treated with surgical excision: 1993-2007. **Veterinary and Comparative Oncology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 65-73, 2012.
- TUTTLE, Allison D. *et al.* Splenic hemangiosarcoma in a corn snake, *Elaphe guttata*. **Journal of Herpetological Medicine and Surgery**, v. 16, n. 4, p. 140-143, 2006.
- WARD, Heidi *et al.* Cutaneous Hemangiosarcoma in 25 Dogs: A Retrospective Study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 345-348, 1994.
- WEAVER, Scott C. *et al.* Guanarito virus (Arenaviridae) isolates from endemic and outlying localities in Venezuela: Sequence comparisons among and within strains isolated from Venezuelan hemorrhagic fever patients and rodents. **Virology**, [s. l.], v. 266, n. 1, p. 189-195, 2000.
- WOZNIAK, E. *et al.* Isolation and characterization of an antigenically distinct 68-kd protein from nonviral intracytoplasmic inclusions in Boa constrictors chronically infected with the inclusion body disease virus (IBDV: Retroviridae). **Veterinary pathology**, v. 37, n. 5, p. 449-459, 2000.
- YONEMARU, Kayoko *et al.* The significance of p53 and retinoblastoma pathways in canine hemangiosarcoma. **Journal of veterinary medical science**, v. 69, n. 3, p. 271-278, 2007.
- ZUCCARI, D. A. P. D.; NARDI, A. B. De. Biologia do Câncer. In: DALECK, Carlos Roberto; NARDI, Andrigo Barboza De. **Oncologia em cães e gatos**. 2. ed. rev. [S. l.]: Roca, 2016. cap. 2, p. 65-87.

5 CARACTERIZAÇÃO ANÁTOMO HISTOPATOLÓGICA DE HEMANGIOSSARCOMA EM *EPICRATES CENCHRIA* (JIBOIA ARCO-ÍRIS) COM DOENÇA DO CORPUSCULO DE INCLUSÃO

5.1 RESUMO

As neoplasias são comuns em serpentes, especialmente em animais idosos. No entanto, o hemangiossarcoma é uma neoplasia pouco documentada em serpentes e nunca antes associada à presença viral. Este estudo tem como objetivo caracterizar o hemangiossarcoma em *Epicrates cenchria* afetadas pela doença do corpúsculo de inclusão e com marcação para *Reptarenavirus* em imuno-histoquímica. Foram analisadas 13 serpentes, das quais 69% eram machos e 31% fêmeas, provenientes de um plantel no qual todos os indivíduos possuem contato cruzado, embora não apresentem ligação genética completa. Foi realizada a biopsia excisional de seis animais e necropsia de dois animais eutanasiados. Os resultados revelaram uma média de 16,7 ± 12,4 nódulos cutâneos por animal, com a região ventral sendo responsável por 69% dos casos e a presença de doença do corpúsculo de inclusão nos animais necropsiados, além de marcação para *Reptarenavirus* em um deles. O hemangiossarcoma apresentou características semelhantes com os casos descritos em outras espécies. Além disso, há suspeita de que o *Reptarenavirus* possa ser o agente predisponente para o desenvolvimento do hemangiossarcoma nesses animais.

Palavras-chave: BIBD; Neoplasia; Serpente; oncogênese viral.

5.2 INTRODUÇÃO

Em répteis, as neoplasias são relativamente comuns, sendo mais prevalentes em serpentes e lagartos e menos em quelônios e crocodilianos. Aproximadamente 2,9% a 15% das serpentes são afetadas por alguma forma de neoplasia (GARNER; HERNANDEZ-DIVERS; RAYMOND, 2004; SYKES; TRUPKIEWICZ, 2006; PAGE-KARJIAN *et al.*, 2017). Além disso, a maioria dos casos de neoplasia em répteis ocorre de forma esporádica, sendo raras as ocorrências de neoplasias múltiplas ou metástases (FRYE, 1994; SYKES e TRUPKIEWICZ, 2006), como o hemangiossarcoma, descrito apenas duas vezes com nódulo único em coração e baço (TUTTLE *et al.*, 2006; SHOEMAKER *et al.*, 2016).

O hemangiossarcoma é uma neoplasia maligna mesenquimal de origem vascular que pode ocorrer em um único foco ou de forma multifocal. Aproximadamente 80% dos animais

apresentaram metástases no momento do diagnóstico, caracterizando-o como uma neoplasia de metástase precoce e agressiva, tornando difícil determinar o local primário da neoplasia (OWEN, 1980; HARGIS *et al.*, 1992; SMITH, 2003; KUSEWITT, 2013; FERNANDES; NARDI, 2016).

A origem das neoplasias pode estar associada a diversos fatores, incluindo fatores genéticos, hormonais, relacionados à idade do animal e virais (KUSEWITT, 2013; CHRISTMAN *et al.*, 2017;). No caso específico da oncogênese viral, alguns *Retrovirus* têm a capacidade de induzir o desenvolvimento de hemangiossarcoma em certas espécies (HEVEZIT; GOFF, 1991; MORGAN; MAJORS; GALILEO, 2005).

A associação entre vírus e neoplasia também foi descrita em serpentes pelo isolamento de *Reptarenavirus* em tecido de fibromixoma odontogênico em jiboia (SIMARD *et al.*, 2020). O *Reptarenavirus* é o agente etiológico da Doença do Corpúsculo de Inclusão em Boídeos (BIBD). Pertencente à família *Arenaviridae*, trata-se de um vírus envelopado com genoma composto por RNA de fita simples, sentido negativo e segmentado (ESCHLI *et al.*, 2006; RADOSHITZKY *et al.*, 2008; BURRI *et al.*, 2012; MAES *et al.*, 2018). Seu genoma é dividido em segmento S, que codifica os precursores de glicoproteínas e nucleoproteínas, e um segmento maior, denominado L, que codifica a RNA polimerase dependente de RNA viral e a proteína de matriz de zinco (PONTREMOLI *et al.*, 2018).

O presente estudo teve como objetivo descrever a anátomo-histopatologia de múltiplos nódulos cutâneos e hepáticos de hemangiossarcoma em um plantel de *Epicrates cenchria* (Jiboia Arco-íris), sem relação genética completa e com contato cruzado entre todos os animais, que por vezes, apresentam BIBD e com marcação para *Reptarenavirus* na imuno-histoquímica, sugerindo uma associação entre o desenvolvimento neoplásico e o vírus.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Autorizações

Os protocolos utilizados no presente projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CAV-UDESC, nº 4821250722, no SISGEN nº AF52CCD e no SISBIO nº 84341-1.

5.3.2 Seleção dos animais e acondicionamento

O estudo foi realizado em 13 animais da espécie *Epicrates cenchria* (Jiboia arco-íris) oriundos de um plantel de serpentes brasileiro, com lesões epiteliais elevadas e de coloração avermelhada, por vezes ulceradas e hemorrágicas, características de hemangiossarcoma.

Os animais foram mantidos em caixas plásticas em sala climatizada e com exaustor. A sala possui 29 animais e desses, 13 apresentam lesões epiteliais características de hemangiossarcoma.

Dos 13 animais, dois animais que apresentavam há seis meses anorexia, emagrecimento progressivo, apatia e regurgitação quando forçada a alimentação foram eutanasiados pelo veterinário responsável do plantel com overdose de propofol na dose de 35 mg/kg. Seis serpentes não apresentavam sinais sistêmicos sendo realizada avaliação histopatológica a partir das amostras de biópsia das lesões. Duas serpentes não apresentavam lesões exofíticas, não sendo realizada avaliação histopatológica, apenas descrição das características macroscópica. Três serpentes estavam em período alimentar, entrando apenas para a estatística de idade, sexo e origem.

5.3.3 Colheita das amostras

Foi realizada a biópsia epitelial de oito animais no plantel e o material colhido foi armazenado em potes identificados com formalina tamponada 10% e processadas no Laboratório de Patologia Veterinária da UDESC. Foram selecionadas para as biópsias lesões pendulares e menos aderidas para facilitar a remoção e não ser necessária sutura ou cicatrização de feridas extensas. Para a colheita das biópsias foi realizado bloqueio anestésico em botão com 0,01 mL de lidocaína 2% (dose) sem vasoconstrictor e utilizado fio de sutura monofilamentar 3-0 para realizar a ligadura das lesões que em seguida eram retiradas com bisturi.

Foi realizada a necrópsia das duas serpentes eutanasiadas e colhido fragmentos das lesões epiteliais sugestivas de hemangiossarcoma bem como de pele, encéfalo, traqueia, pulmão, coração, esôfago, estomago, intestino, fígado, baço, pâncreas, vesícula biliar, gônadas e rins e armazenado em frascos com formalina tamponada 10%. Também foram colhidos fragmentos dos mesmos órgãos, acondicionados em microtubos de 2 mL e armazenado em freezer -80°C para futura avaliação microbiológica.

5.3.4 Caracterização anatomo histopatológica e imunohistoquímica

Todas as lesões epiteliais sugestivas de hemangiossarcoma foram quantificadas conforme sua localização (ventral, lateral ou dorsal), medidas com a utilização de paquímetro (comprimento x largura) e caracterizadas conforme formato, coloração, consistência, integridade, ulceração e delimitação.

Para exame histopatológico o material foi fixado em formalina tamponada 10% durante 48 horas. Os órgãos foram clivados, incluído em blocos de parafina e processados rotineiramente pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), para visualização em microscopia óptica.

Para definir o estadiamento dos nódulos cutâneos, foi utilizada a Tabela 3 adaptada dos autores Owen, 1980 e Fernandes e Nardi, 2016.

Tabela 3 Estadiamento do hemangiossarcoma cutâneo com base na descrição do local primário com a localização da neoplasia.

Estágio	Descrição	Localização
I	Tumor primário confinado apenas à derme.	Normalmente região ventral abdominal ou prepucial.
II	Tumor primário envolvendo a hipoderme, com ou sem envolvimento concomitante da derme e sem envolvimento muscular.	Nenhum lugar específico.
III	Qualquer tumor primário com envolvimento muscular.	Nenhum lugar específico.

Fonte: adaptado de Owen, 1980 e Fernandes e Nardi, 2016. Elaborada pelo autor, 2023.

Para definir o grau de diferenciação das neoplasias, foi utilizada a descrição de Sabattini e colaboradores 2009, sendo definido que: tumores com anisocariose discreta e canais vasculares preservados, são classificados como bem diferenciados; tumores com no mínimo 50% dos canais vasculares bem definidos e anisocariose moderada são considerados moderadamente diferenciados, já tumores sólidos, com canais vasculares não preservados e elevada anisocariose, são considerados como pouco diferenciados.

Foram realizadas também lâminas para imuno-histoquímica (IH) utilizando a técnica já descrita em Hetzel *et al.*, (2013) e Hepojoki *et al.*, (2015). Essa técnica foi realizada na Universidade de Zurich, instituição parceira do projeto.

5.3.5 Colorações especiais:

Para o nódulo observado no estômago da fêmea necropsiada, foi realizada a coloração de Tricrômico de Masson para determinar a origem tecidual do nódulo. Também, foi utilizada a coloração de Ziehl Neelsen nos granulomas, para pesquisa de *Mycobacterium*.

5.3.6 Analise estatística:

Foi realizada a analise descritiva das lesões de hemangiossacroma epitelial e hepático, e também dos achados de necropsia e histopatológico. Os dados foram compilados e analisados utilizando o software R® para a determinação de média e desvio padrão.

5.4 RESULTADOS

O plantel apresentava 363 animais e oito espécies de serpentes. Das oito espécies presentes no plantel, apenas uma de duas salas de *Epicrates cenchria* apresentava animais com lesões cutâneas sugestivas de hemangiossarcoma. Essa possui 29 animais, os quais têm contato cruzado durante a época de reprodução. Dos 29 animais, 55% (16/29) não apresentam tais lesões e 45% (13/29) apresentavam as lesões mencionadas. A média de idade dos animais sem lesões foi de $2,5 \text{ anos} \pm 0,5$ (valor mínimo 2 anos; valor máximo 3 anos). Todos os animais sem lesões nasceram no plantel, sendo 50% (8/16) fêmeas e 50% (8/16) machos.

Dentre os animais afetados, 69% (9/13) eram machos e 31% (4/13) fêmeas. A média de idade foi de $14,7 \pm 0,95$ anos (valor mínimo 14 anos; valor máximo 16 anos). Dos animais acometidos 54% (7/13) eram oriundos de quatro locais diferentes externo ao plantel e 46% (6/13) nasceram no local de estudo. Quanto a data da primeira lesão, estima-se que tenha ocorrido há mais de oito anos e todos os animais acometidos no momento do estudo estavam com as lesões há mais de cinco anos.

Com relação as características macroscópicas dos nódulos cutâneos (Quadro 1), foi observado que a região topográfica mais afetada foi a ventral. Os nódulos foram classificados e contados de acordo com sua localização na região ventral, lateral e dorsal. Quando o animal apresentava mais de 20 nódulos em uma das regiões foi descrito apenas como "maior que 20".

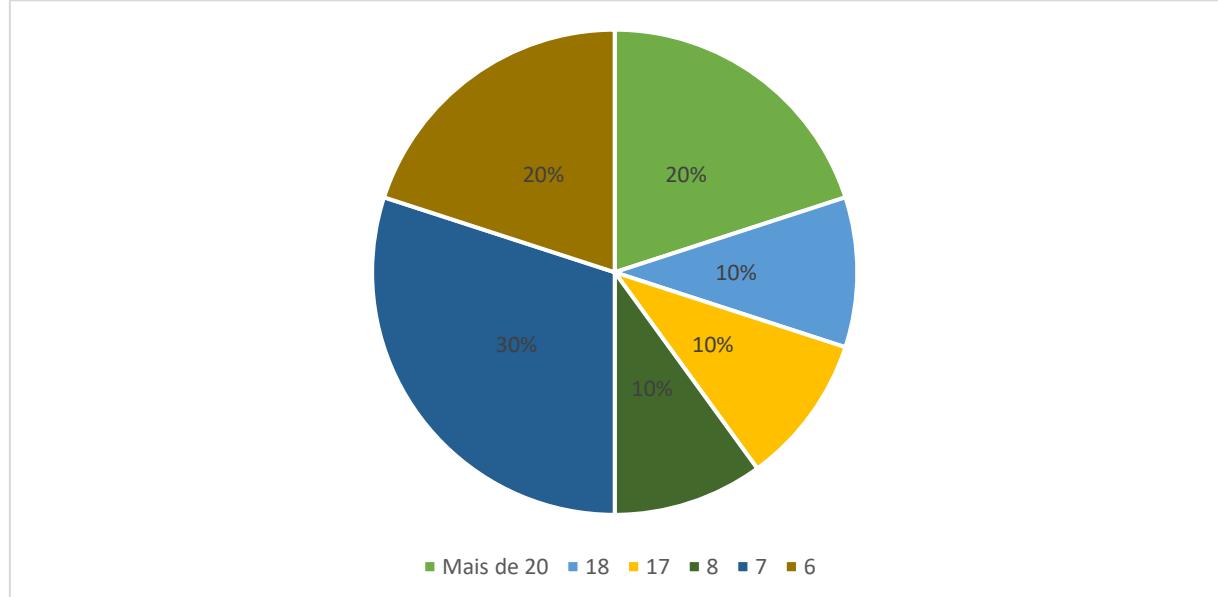
Quadro 1 Características topográficas e macroscópicas de nódulos cutâneos de hemangiossarcoma em 10 *Epicrates cenchria*.

Quantidade de nódulos por animal:	$\mu: 16,7 \pm 12,4$ nódulos por animal	Mínimo 7 nódulos em um animal	Máximo 46 nódulos em 1 animal
Topografia dos nódulos:	69% ventrais	24% laterais	7% dorsais
Tipo de aumento de volume:	54% máculas	30% endofíticos	16% exofíticos
Tamanho:	Mínimo: 0,1 cm	Máximo: 1,2 cm	
Consistência:	Macia a firme		
Coloração:	Predominante: Vermelho-escuro a marrom escuro	Também descrita: Enegrecido e amarelado	
Presença de úlcera:	40% dos animais apresentaram úlcera em ao menos um nódulo	60% dos animais não apresentaram nódulos ulcerados	

Fonte: elaborada pelo autor, 2023.

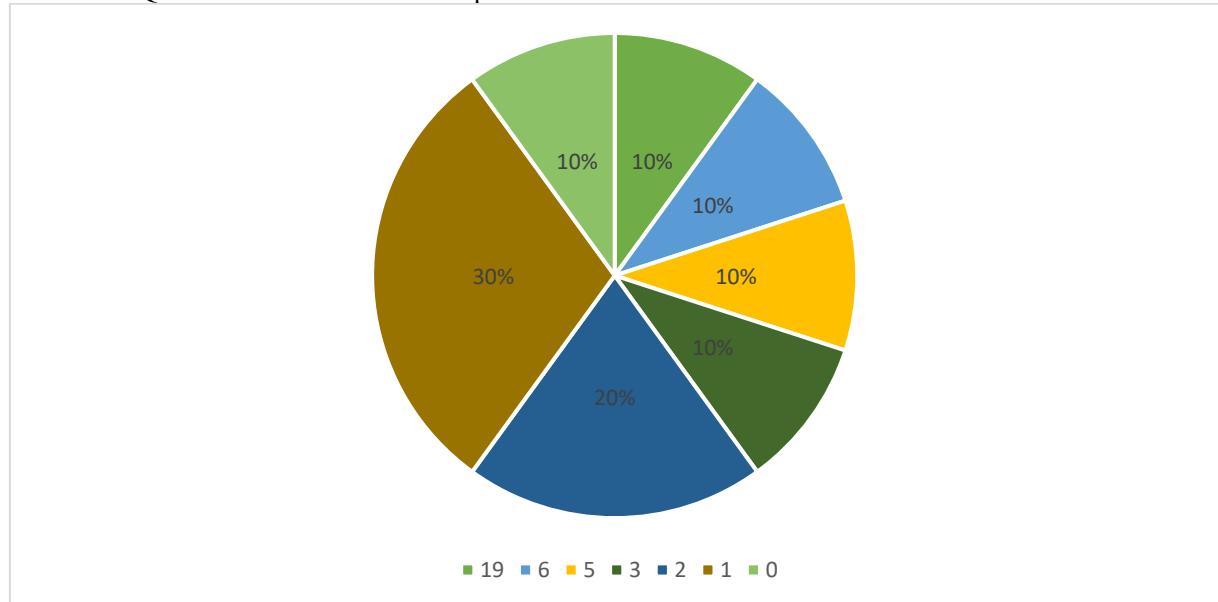
No que diz respeito a distribuição dos nódulos ventrais, verificou-se que a média de nódulos ventrais por animal foi de $11,6 \pm 6,23$ (Gráfico 1). Quanto aos nódulos laterais, foi observada uma média de $4,0 \pm 5,6$ nódulos laterais por animal (Gráfico 2). Já os dorsais, apresentaram uma média de $1,1 \pm 2,2$ nódulos por animal (Gráfico 3).

Gráfico 1 – Quantidade de nódulos ventrais por animal.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

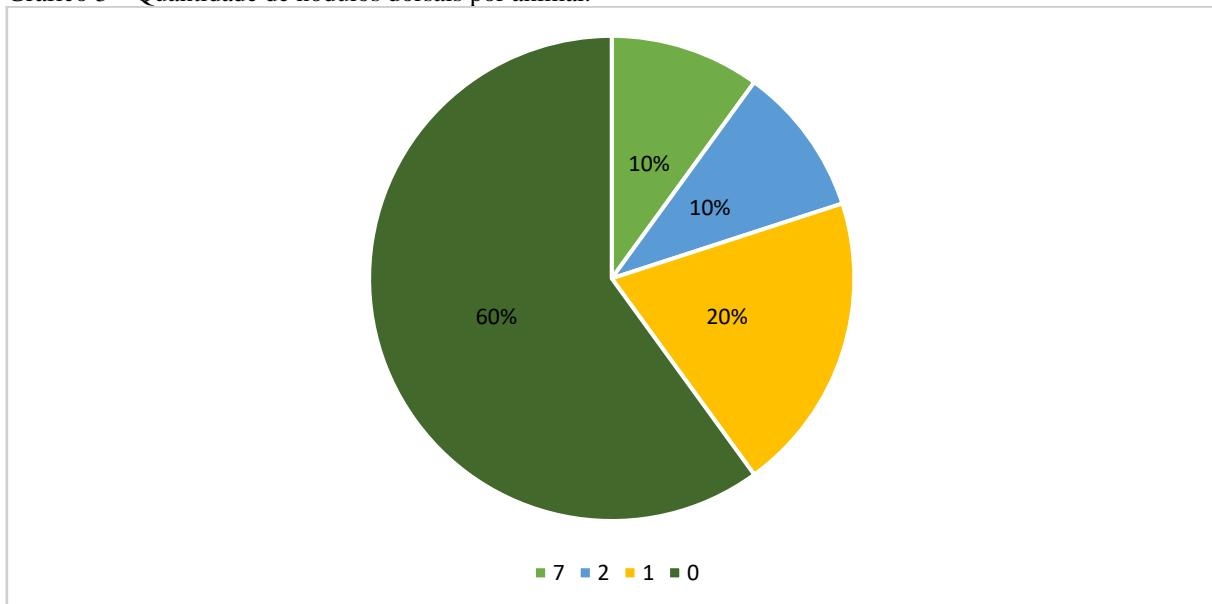
Gráfico 2 – Quantidade de nódulos laterais por animal.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

De modo geral, 69% (116/167) dos nódulos cutâneos estavam localizados na região ventral (Figura 1.A), 24% (40/167) na região lateral (Figura 1.G) e 7% (11/167) na região dorsal (Figura 1.H).

Gráfico 3 – Quantidade de nódulos dorsais por animal.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

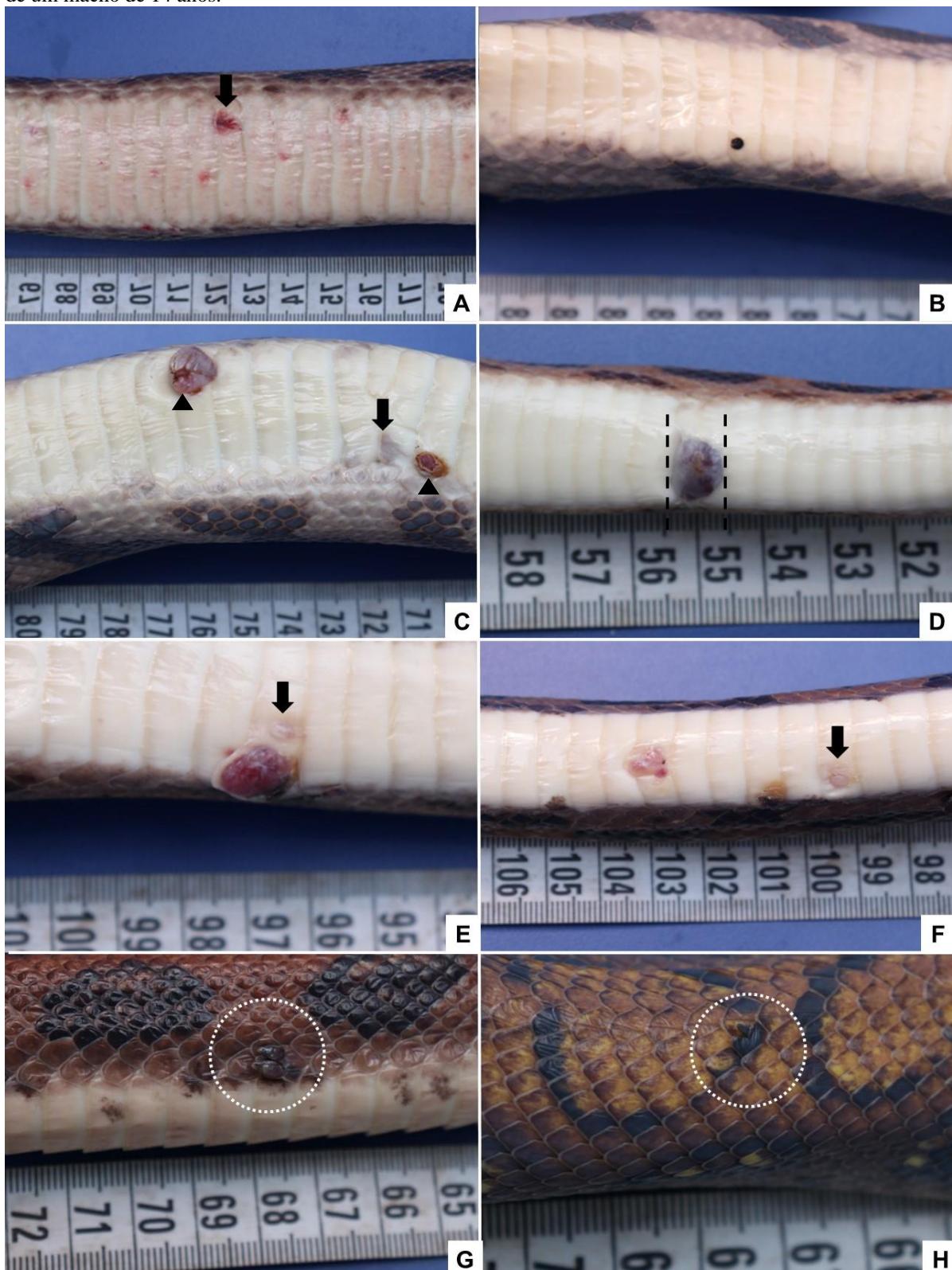
Com relação às características dos nódulos cutâneos, constatou-se que 16% (26/167) dos nódulos eram exofíticos (Figura 1.E e 1.G), 30% (51/167) eram endofíticos (Figura 1.C e 1.D) e 54% (90/167) eram máculas (Figura 1.A). O tamanho dos nódulos variou de 0,1 cm a 1,2 cm e sua consistência abrangia de macia a firme. Em relação à coloração, predominou a tonalidade vermelho-escuro (Figura 1.D) a marrom-escuro, com algumas ocorrências de nódulos enegrecidos (Figura 1.B) e amarelados.

Observou-se que 40% (4/10) dos animais apresentaram pelo menos um nódulo ulcerado (Figura 1.C). Além disso, alguns animais exibiam lesões com características de cicatrização (Figura 1.C, 1.D e 1.F), indicando a remoção prévia de alguns nódulos por meio do uso de bisturi elétrico.

Foram realizadas biópsias de 15 nódulos cutâneos e foram coletados 20 nódulos durante as necropsias. Dois animais não apresentaram nódulos possíveis de serem coletados devido à presença apenas de pequenos nódulos endofíticos e máculas. Para as biópsias, foram selecionados nódulos exofíticos devido à facilidade de recuperação dos animais após o procedimento, uma vez que os nódulos endofíticos requereriam sutura da pele e cuidados pós-procedimento mais intensivos. Dos animais necropsiados, foram coletados nódulos endofíticos e máculas.

Quanto à histologia (Quadro 2), os nódulos cutâneos estavam restritos à derme superficial e profunda, não sendo observados na musculatura (Tabela 4). Todos os nódulos eram não encapsulados e bem delimitados. Quanto aos arranjos histológicos, foram identificados nódulos capilares (Figura 2.B) compostos por canais vasculares irregulares em 87,5% (7/8) dos

Figura 1 - Hemangiossarcoma cutâneo em machos de *Epicrates cenchria*. (A) Máculas avermelhadas multifocal em região ventral de um macho de 16 anos (seta). (B) Nódulo endofítico enegrecido em região ventral de um macho de 16 anos. (C) Dois nódulos endofíticos ulcerados (ponta da seta) e área cicatricial (seta) em região ventral de macho de 14 anos. (D) Nódulo endofítico vermelho escuro de 0,9 cm de diâmetro em região ventral de um macho de 15 anos. (E) Nódulo exofítico avermelhado e área cicatricial (seta) em região ventral de um macho de 16 anos. (F) Áreas cicatriciais (seta) em região ventral de macho de 16 anos. (G) Dois nódulos exofíticos (círculo pontilhado) em região lateral de um macho de 14 anos. (H) Nódulo exofítico (círculo pontilhado) em região dorsal de um macho de 14 anos.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Quadro 2 - Características histológicas de nódulos cutâneos de hemangiossarcoma em *Epicrates cenchria*.

Localização:	Restrito a derme superficial: 50% dos animais.	Ao menos um nódulo em derme superficial e profunda: 50% dos animais.		
Presença de capsula:	Ausente em 100% dos animais.			
Arranjo:	Nódulos capilares: presente em 87,5% dos animais.	Nódulos capilares com áreas cavernosas: 50% dos animais.	Nódulos sólidos com áreas capilares: 50% dos animais.	Nódulos sólidos: 12,5% dos animais.
Morfologia celular	células fusiformes a alongadas ou poliédricas em 100% dos nódulos.			
Núcleo	arredondados, centrais e com cromatina densa em 100% dos nódulos.			
Nucléolo	Pouco evidente e único: 50% dos animais	Inconspícuo: 37,5% dos animais	Evidente e único a duplo: 12,5% dos animais	
Citoplasma	Pouco delimitado e escasso: 75% dos animais.	Moderadamente delimitado com quantidade discreta a moderada: 25% dos animais		
Anisocitose e anisocariose	Moderada: 50% dos animais	Discreta: 25% dos animais	Acentuada: 25% dos animais	
Mitoses	Uma figura de mitose por 2,37 mm ² em 50% dos animais			

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023

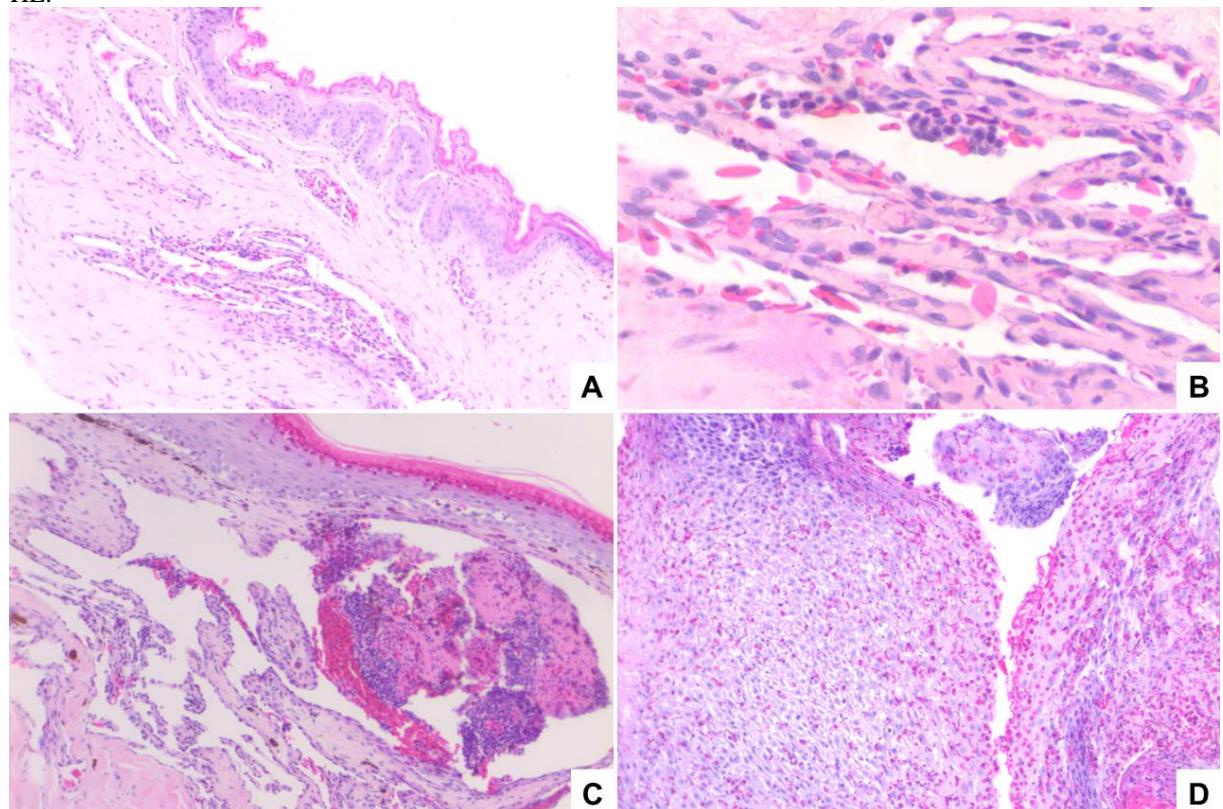
Tabela 4 - Estadiamento das *Epicrates cenchria* com relação aos nódulos cutâneos de hemangiossarcoma.

Estadiamento	Quantidade de animais
I	50%
II	50%
III	0%

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

animais analisados; predominantemente capilares com áreas cavernosas (Figura 2.C) em 50% (4/8) dos animais; predominantemente sólidos com áreas capilares (Figura 2.A) em 50% (4/8) dos animais; e completamente sólidos (Figura 2.D), com perda dos canais vasculares, em 12,5% (1/8) dos animais, podendo assim, definir o grau de diferenciação das neoplasias. Foi observado que 50% dos animais possuíam alto grau de diferenciação das neoplasias, 37,5% possuíam ao menos um tumor com grau moderado de diferenciação e 12,5% ao menos um tumor com baixo grau de diferenciação.

Figura 2 – Fotomicrografia de arranjo histológico dos nódulos cutâneos de hemangiossarcoma em *Epicrates cenchria*. (A) Nódulo composto por áreas sólidas e vasos de pequeno e médio calibre, HE (B) Capilar: Nódulo composto por vasos de pequeno calibre com células neoplásicas fusiformes a alongadas, de núcleo arredondado, central, com cromatina densa e nucléolo pouco evidente, além de citoplasma pouco delimitado e escasso, HE. (C) Área cavernosa: Nódulo composto por vasos de médio calibre, HE (D) Sólido: Nódulo composto por áreas sólidas, HE.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Em relação à morfologia celular, todos os nódulos apresentaram células fusiformes a alongadas ou poliédricas, com núcleos arredondados, centrais e com cromatina densa. A aparência dos nucléolos variou de pouco evidente e único em 50% (4/8) dos animais, inconsúpicio em 37,5% (3/8) animais, e evidente e único a duplo em 12,5% (1/8) dos animais. O citoplasma foi observado como pouco delimitado e escasso em 75% (6/8) dos animais e moderadamente delimitado, com quantidade discreta a moderada, em 25% (2/8) dos animais. Anisocitose e anisocariose foram descritas como moderadas em 50% (4/8) dos animais, discretas em 25% (2/8) dos animais e acentuadas em 25% (2/8) dos animais. Foi observada uma

figura de mitose a cada 2,37 mm² em 50% (4/8) dos animais. Com essas características foi confirmado o diagnóstico morfológico de hemangiossarcoma em todos os nódulos colhidos.

Quanto às alterações encontradas adjacente ao neoplasma, observou-se infiltrado heterofílico multifocal discreto em 25% (2/8) dos animais e moderado em 50% (4/8). Foi identificado infiltrado linfoplasmocitário multifocal discreto em 50% (4/8) dos animais, moderado em 12,5% (1/8) dos animais e discreto em derme profunda em 12,5% (1/8) dos animais. Além disso, foram observadas espongiosis multifocal discreta em 25% (2/8) dos animais, hiperqueratose paraqueratótica difusa moderada em 25% (2/8) dos animais e acentuada em 12,5% (1/8) dos animais, hemorragia multifocal discreta em 25% (2/8) dos animais, acantose multifocal moderada em 12,5% (1/8) dos animais, necrose em epiderme focalmente extensa moderada em 12,5% (1/8) dos animais, e uma área com centro de necrose caseosa circundada por macrófagos epitelioides e células gigantes multinucleadas focalmente discreta em 12,5% (1/8) dos animais.

Com relação aos animais submetidos a necropsia, ambos apresentavam histórico de regurgitação, emagrecimento progressivo, anorexia e apatia. Nos últimos cinco anos, oito animais da mesma sala foram a óbito com os mesmos sinais clínicos e presença de lesões cutâneas sugestivas de hemangiossarcoma.

No caso da fêmea de comprimento rostro-cloacal era de 147 cm, idade de 16 anos e score corporal 2/5. Na pele, foram encontrados 18 nódulos cutâneos ventrais e seis laterais, com diâmetro variando de 0,1 cm a 1,0 cm (Figura 3.A e 3.B). No tecido subcutâneo, havia um aumento de volume bem delimitado, de 0,6 cm de diâmetro, com coloração amarelo-esverdeada, consistência firme a friável.

Na cavidade celomática, foi observado acúmulo discreto de líquido translúcido levemente avermelhado, localizado principalmente na topografia dos ovários (Figura 3.C). No fígado, foram identificados aumentos de volume arredondados de 0,1 cm a 0,4 cm de diâmetro, com coloração esbranquiçada multifocal a coalescente e consistência macia (Figura 3.D). Além disso, havia um nódulo de 1 cm de diâmetro na região cranial do fígado, apresentando forma arredondada e consistência macia (Figura 3.E). Ao ser cortado, o nódulo exibia coloração esbranquiçada a avermelhada, além de manchas vermelho-escuro a enegrecidas multifocal no parênquima do órgão (Figura 3.F), que estava aumentado de tamanho e difuso moderadamente.

Foi observado um nódulo firme, não aderido, com dimensões de 3,7 x 1 cm, localizado na região cranial do rim direito. Ao ser seccionado, o nódulo apresentava coloração esbranquiçada a amarelada, com áreas de consistência friável. No estômago, foi identificado

um nódulo elevado (Figura 3.G), transmural, firme, esbranquiçado e com 1 cm de diâmetro (Figura 3.H).

Na avaliação histológica, o fígado da fêmea apresentou múltiplas proliferações neoplásicas mesenquimais malignas entremeadas ao parênquima compatíveis com hemangiossarcoma (Figura 4.A). Os hemangiossarcomas formavam vasos de pequeno e médio calibre, preenchidos por eritrócitos e trombos, e não estavam encapsulados. As células neoplásicas eram fusiformes a alongadas, com núcleos arredondados ou por vezes reniformes, geralmente com um ou dois núcleos, cromatina frouxa e um nucléolo evidente e único. O citoplasma das células era pouco delimitado. Observou-se acentuado grau de anisocariose e anisocitose, além de uma taxa de mitose de duas figuras por $2,37 \text{ mm}^2$. Notou-se também a presença de infiltrado discreto heterofílico entremeadas ao neoplasma.

Ainda no parênquima hepático, foi possível observar degeneração hepatocelular difusa acentuada, acompanhada de proliferação acentuada de melanomacrófagos de forma multifocal (Figura 4.B). Também foram observadas áreas de necrose, às vezes acompanhadas de mineralização central, rodeadas por células heterofílicas, linfócitos e plasmócitos, e mais internamente por macrófagos e células gigantes multinucleada (Figura 4.C). Também foi possível observar a presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos em hepatócitos de forma focal e discreta. As áreas observadas foram diagnosticadas morfologicamente como granulomas e não apresentando marcação na coloração de Ziehl Neelsen.

No rim, foi observado acúmulo difuso acentuado de grânulos acastanhados e mineralização multifocal discreta nos túbulos contorcidos proximais.

No estômago, foi identificada uma proliferação neoplásica mesenquimal maligna organizada em feixes multidirecionais, não encapsulada e com estroma fibrovascular escasso na camada muscular (Figura 4.D). As células neoplásicas apresentavam-se fusiformes, com núcleos arredondados a ovais, cromatina levemente frouxa, nucléolo pouco evidente e único, além de citoplasma pouco distinto e eosinofílico. Foi observada anisocariose acentuada anisocariose, anisocitose moderada e uma figura de mitose por $2,37 \text{ mm}^2$. Foi observado também infiltrado linfoplasmocitário discreto entre o neoplasma. Foi realizada a coloração de Tricômico de Masson, através da qual, foi possível concluir o diagnóstico morfológico da neoplasia como leiomiossarcoma.

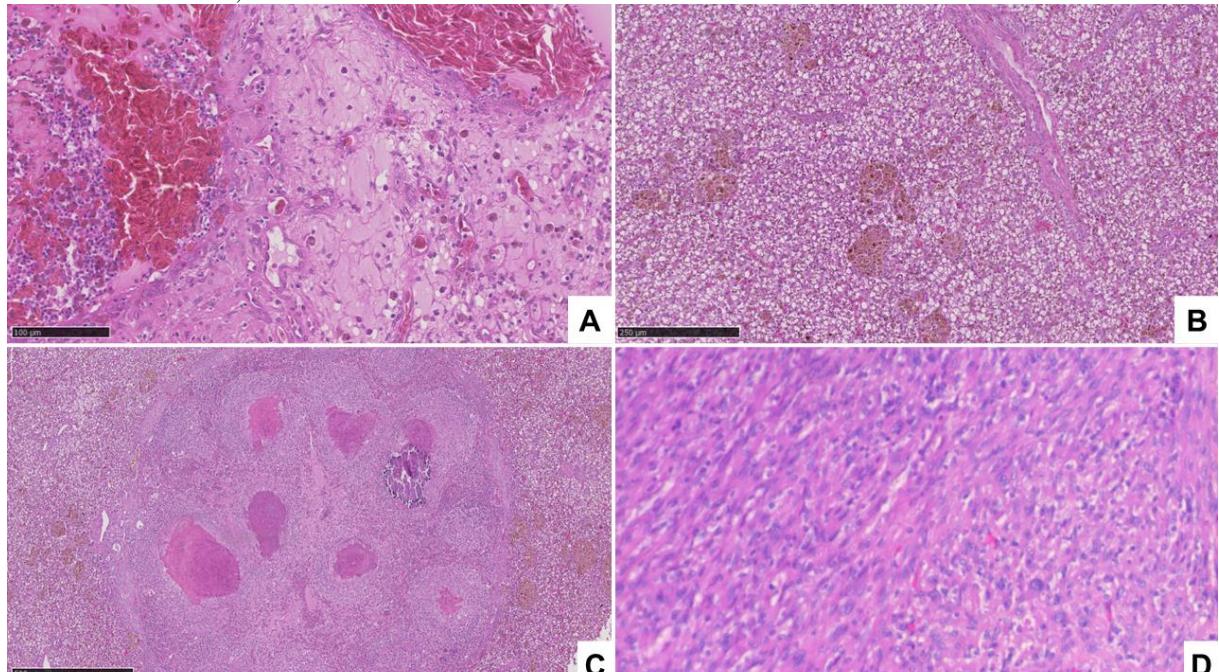
No nódulo subcutâneo, foram encontradas áreas de necrose caseosa, ocasionalmente acompanhadas de mineralização central. Essas áreas necróticas estavam circundadas por células

Figura 3 - Necropsia de uma fêmea de *Epicrates cenchria* com hemangiossarcoma cutâneo e hepático. (A) Animal em posição ventrodorsal com distribuição difusa de nódulos cutâneos de hemangiossarcoma. (B) Imagem aproximada da porção ventral com nódulos de hemangiossarcoma. Na miniatura, um nódulo cutâneo, ao corte, demonstrando coloração vermelho-escura a esbranquiçada. (C) Acúmulo discreto de líquido serossanguinolento em cavidade celomática. (D) Fígado com nódulos esbranquiçados multifocal a coalescente. (E) Nódulo de 1 cm de diâmetro em região cranial do fígado. (F) Nódulo esbranquiçado (seta) e vermelho-escuro (círculo tracejado) em parênquima hepático (corte transversal). (G e H) Nódulo elevado transmural em estomago, ao corte, esbranquiçado.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Figura 4 – Fotomicrografia histológica de hemangiossarcoma hepático, granuloma hepático e leiomiossarcoma de fêmea de *Epicrates cenchria*. (A) Hemangiossarcoma hepático com vasos de pequeno e médio calibre preenchidos por eritrócitos e trombos, não encapsulado. (B) Fígado com focos de melanomacrófagos e degeneração acentuada, HE. (C) Granuloma hepático com áreas de necrose e mineralização circundadas por heterófilos, linfócitos e plasmócitos e mais internamente por macrófagos e células gigantes multinucleadas, HE. (D) Leiomiossarcoma em estômago, com proliferação celular organizada em feixes multidirecionais, não encapsulado e de estroma fibrovascular escasso, HE.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

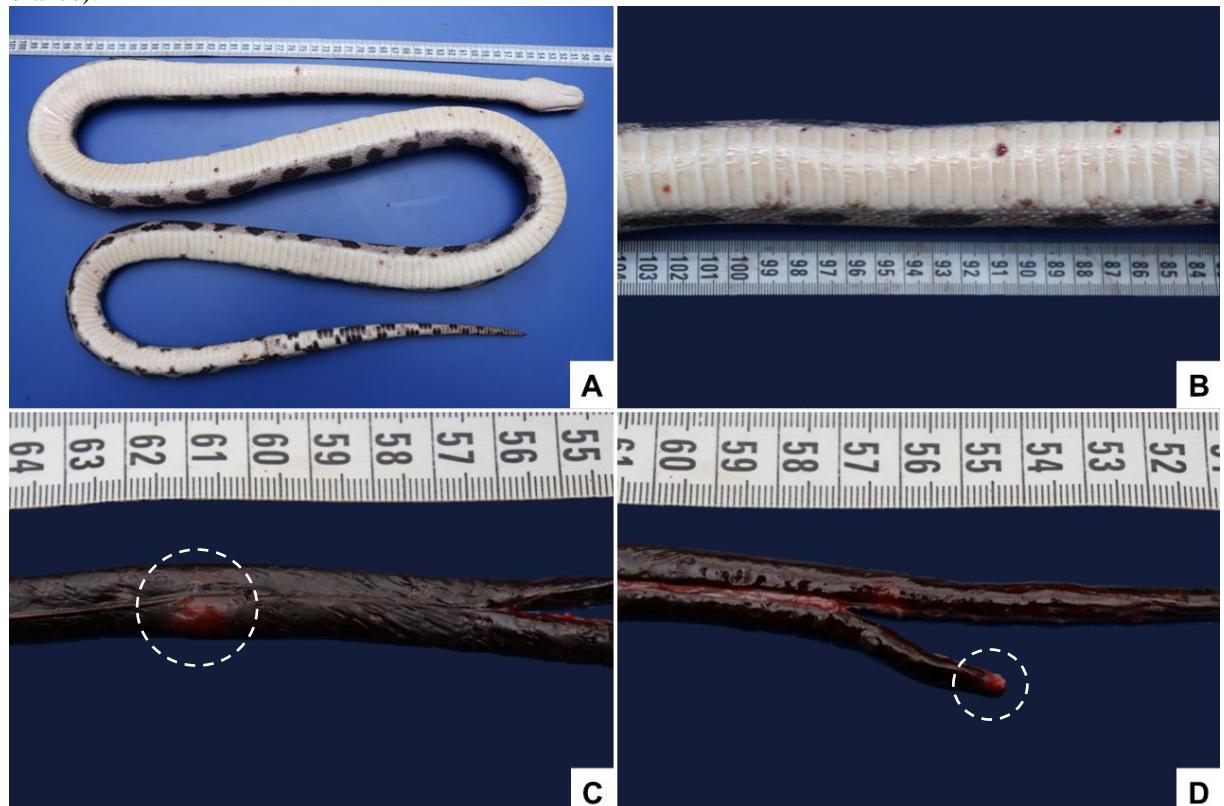
gigantes multinucleadas, macrófagos epitelioides, heterófilos, linfócitos e plasmócitos. O achado foi considerado focalmente extenso moderado e estava circundado por tecido adiposo bem diferenciado. No nódulo cranial ao rim direito, havia um material amorfó fibrilar fortemente eosinofílico parcialmente delimitado por uma fina camada de tecido fibroso. Também foi observado infiltrado de macrófagos de forma multifocal discreta associado a esse material. No pulmão, uma área de necrose caseosa estava presente e era circundada por células gigantes multinucleadas, macrófagos epitelioides, heterófilos, linfócitos e plasmócitos. Além disso, houve deposição moderada e multifocal de material amorfó eosinofílico nos alvéolos. Os dois nódulos e a área de necrose caseosa pulmonar foram diagnosticados morfologicamente como granulomas e não apresentaram marcação na coloração de Ziehl Neelsen.

O cérebro, coração, esôfago, intestino delgado, intestino grosso, pâncreas, língua, traqueia e globo ocular da fêmea foram avaliados, mas não foram observadas alterações significativas nesses órgãos.

No caso do macho de comprimento rostro-cloacal de 161 cm, 15 anos e score corporal 3/5. Na pele, foram encontrados mais de 20 nódulos cutâneos ventrais, 19 laterais e 7 dorsais, com diâmetro variando de 0,1 cm a 1,2 cm (Figura 5.A e 5.B).

Na cavidade celomática, o fígado apresentava nódulos esbranquiçados a avermelhados com tamanhos variando de 0,2 a 1,0 cm de diâmetro. Esses nódulos estavam distribuídos difusamente por todo o parênquima hepático, podendo apresentar discreta elevação, delimitação moderada e consistência macia (Figura 5.C e 5.D).

Figura 5 - Necropsia de um macho de *Epicrates cenchria* com hemangiossarcoma cutâneo e hepático. (A) Animal em posição ventrodorsal com distribuição difusa de nódulos cutâneos de hemangiossarcoma. (B) Imagem ampliada da porção ventral com nódulos de hemangiossarcoma. (C) Nódulos avermelhado de aproximadamente 1 cm (círculo pontilhado branco) em fígado. (D) Porção caudal do fígado com nódulos avermelhados (círculo pontilhado branco).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Na avaliação microscópica do fígado, foi observada a presença de múltiplas proliferações neoplásicas mesenquimais malignas intercaladas no parênquima hepático compatíveis com hemangiossarcoma (Figura 6.A). Essas proliferações formavam vasos de pequeno e médio calibre preenchidos por eritrócitos e trombos, não encapsuladas. As células neoplásicas eram fusiformes a alongadas (Figura 6.B), com núcleo arredondado e cromatina frouxa, além de um único nucléolo evidente. O citoplasma das células era pouco distinto e moderado. Houve a presença de anisocariose e anisocitose moderadas, bem como uma figura de mitose por área de 2,37mm². Foi observado infiltrado heterofílico (Figura 6.C) e linfoplasmocitário multifocal moderado a acentuado entremeado ao neoplasma.

No parênquima hepático, também foram identificadas áreas de degeneração hepatocelular multifocal discreta (Figura 6.C), bem como corpúsculos de inclusão

intracitoplasmáticos eosinofílicos presentes no interior dos hepatócitos de forma difusa e acentuada (Figura 6.A, 6.B e 6.C). Também, foi observada a proliferação moderada de melanomacrófagos.

No baço, foi identificada necrose associada a infiltrado heterofílico e linfoplasmocitário focalmente extenso e moderado, além da presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmático eosinofílico multifocal discreto (Figura 7.E e 7.F). E, no pulmão foi identificada congestão difusa discreta.

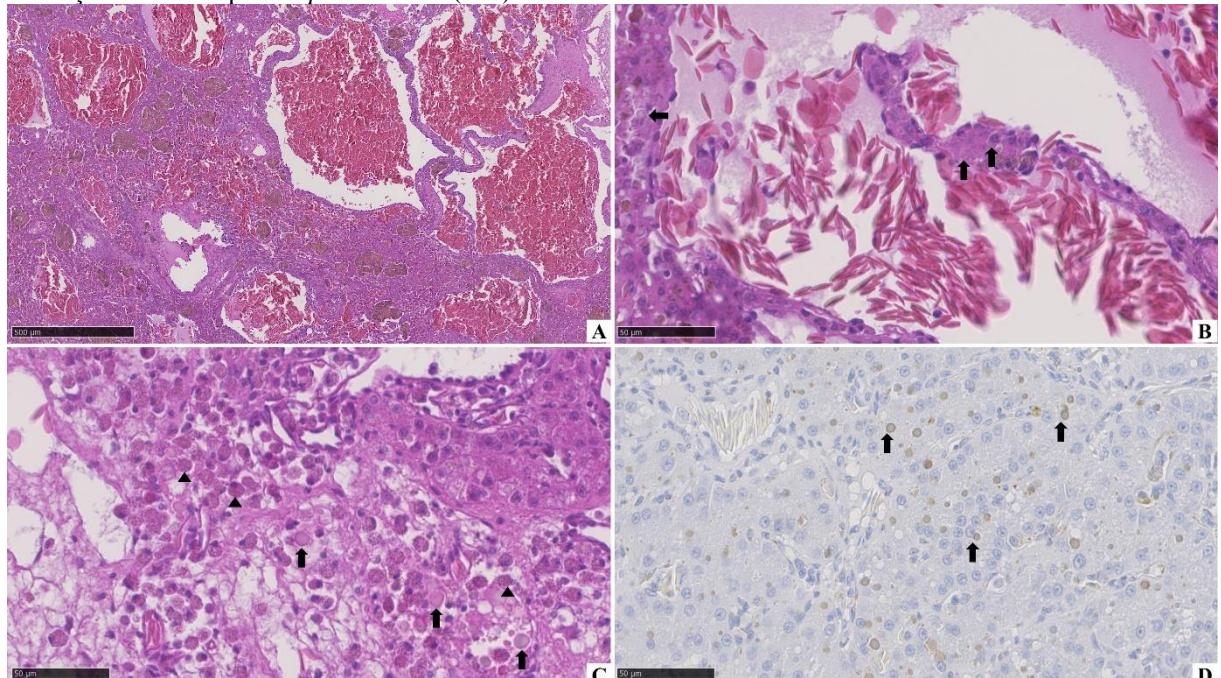
Nos rins, foram encontrados acúmulos de grânulos acastanhados multifocal moderados, bem como corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos nos túbulos proximais com intensidade moderada (Figura 8.A e 8.B).

Os testículos apresentaram degeneração tubular difusa moderada, fibrose multifocal discreta (Figura 8.E) e corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos difusa e com intensidade acentuada (Figura 8.E e 8.F). Em epidídimo também foi observada a presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos difusa e com intensidade acentuada (Figura 8.G e 8.H).

No cérebro (Figura 7.A, 6.B, 7.C e 7.D), adrenais (Figura 8.C e 8.D), esôfago (Figura 9.A e 9.B), estômago (Figura 9.C e 9.D), intestino delgado (Figura 9.E e 9.F) e intestino grosso (Figura 9.G e 9.H), foi observada a presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos multifocais moderados no epitélio. No pâncreas (Figura 7.G e 7.H), os corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos foram encontrados de forma difusa moderada a acentuada. Não foram identificadas alterações no coração, tireoide, globo ocular, língua e traqueia.

A imuno-histoquímica para *Reptarenavirus* foi realizada nos órgãos que apresentaram presença de corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico, também em duas amostras de biopsia de pele (Tabela 5).

Figura 6 - Fotomicrografia histológica e imuno-histoquímica de fígado do macho de *Epicrates cenchria*. (A) Hemangiossarcoma com vasos de pequeno e médio calibre preenchidos por eritrócitos e trombos, não encapsulado. Além de melanomacrófagos multifocal. (B) Trabécula do hemangiossarcoma com corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico (seta), HE. (C) Degeneração hepática com corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico (seta) e infiltrado heteróflico (ponta da seta), HE. (D) Imuno-histoquímica com marcação moderada para *Reptarenavirus* (seta), IHC.



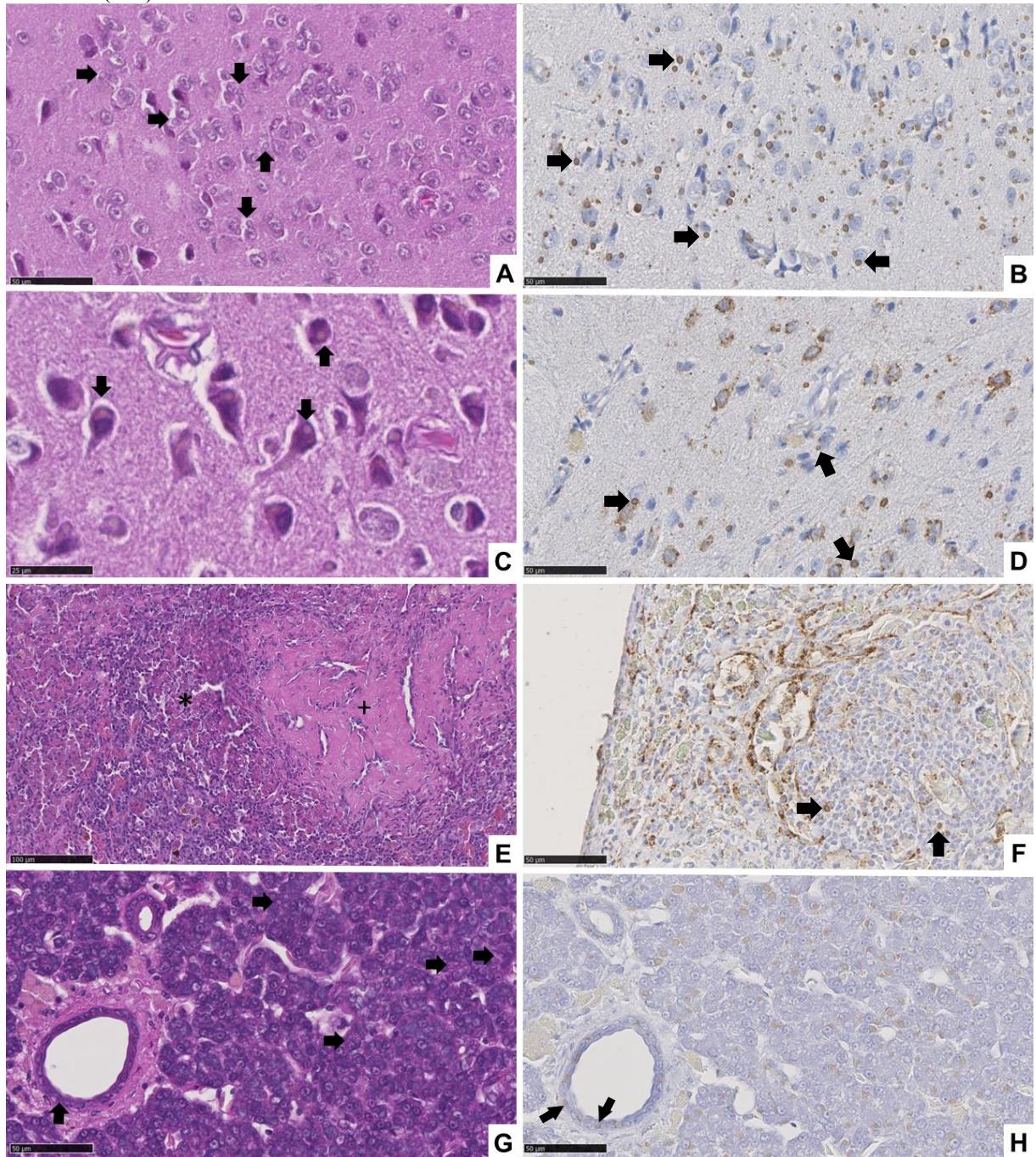
Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Tabela 5: Imuno-histoquímica para *Reptarenavirus* realizada nos órgãos com presença de corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico de *Epicrates cenchria* necropsiadas com hemangiossarcoma. Com relação a intensidade da marcação: + (discreta), ++ (modera), +++ (acentuada), - (negativo) e I (inconclusivo).

Animal	Órgão	Intensidade
Macho	Fígado	++
	Cérebro	+++
	Coração	-
	Esôfago	+++
	Estômago	++
	Intestino delgado	+
	Intestino grosso	+
	Baço	+
	Rim	++
	Testículo	++
	Epidídimos	+++
	Adrenal	+
	Pâncreas	+++
Fêmea	Fígado	I
	Cérebro	-
	Coração	-
	Rim	-
Animal 1	Biopsia de pele	I
Animal 2	Biopsia de pele	-

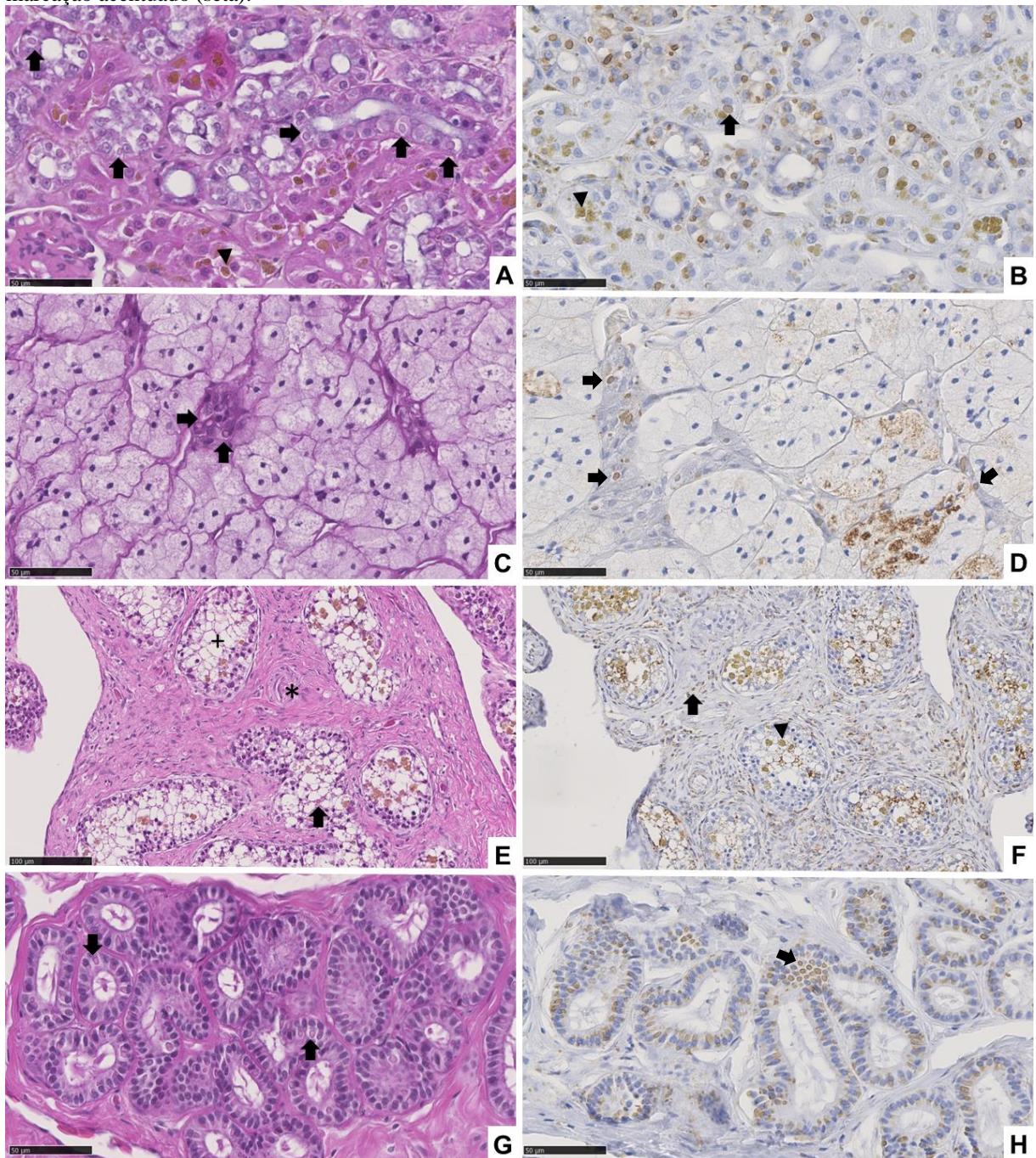
Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Figura 7 – Fotomicrografia histológica e imuno-histoquímica de um macho de *Epicrates cenchria* com hemangiossarcoma epitelial e hepático associado com BIBD e marcação positiva pra *Reptarenavírus* na imuno-histoquímica. (A) Em cérebro, corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em corpo neurônios (seta), HE. (B e D) IH do cérebro com marcação acentuada (seta). (C) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em corpo neuronal (ponta da seta), HE. (E) Necrose (indicada pelo +) associada a infiltrado inflamatório focalmente extenso e moderado no braço, HE. (F) IH do baço com marcação discreta (seta). (G) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em pâncreas (seta), HE. (H) IH do pâncreas com marcação acentuada (seta).



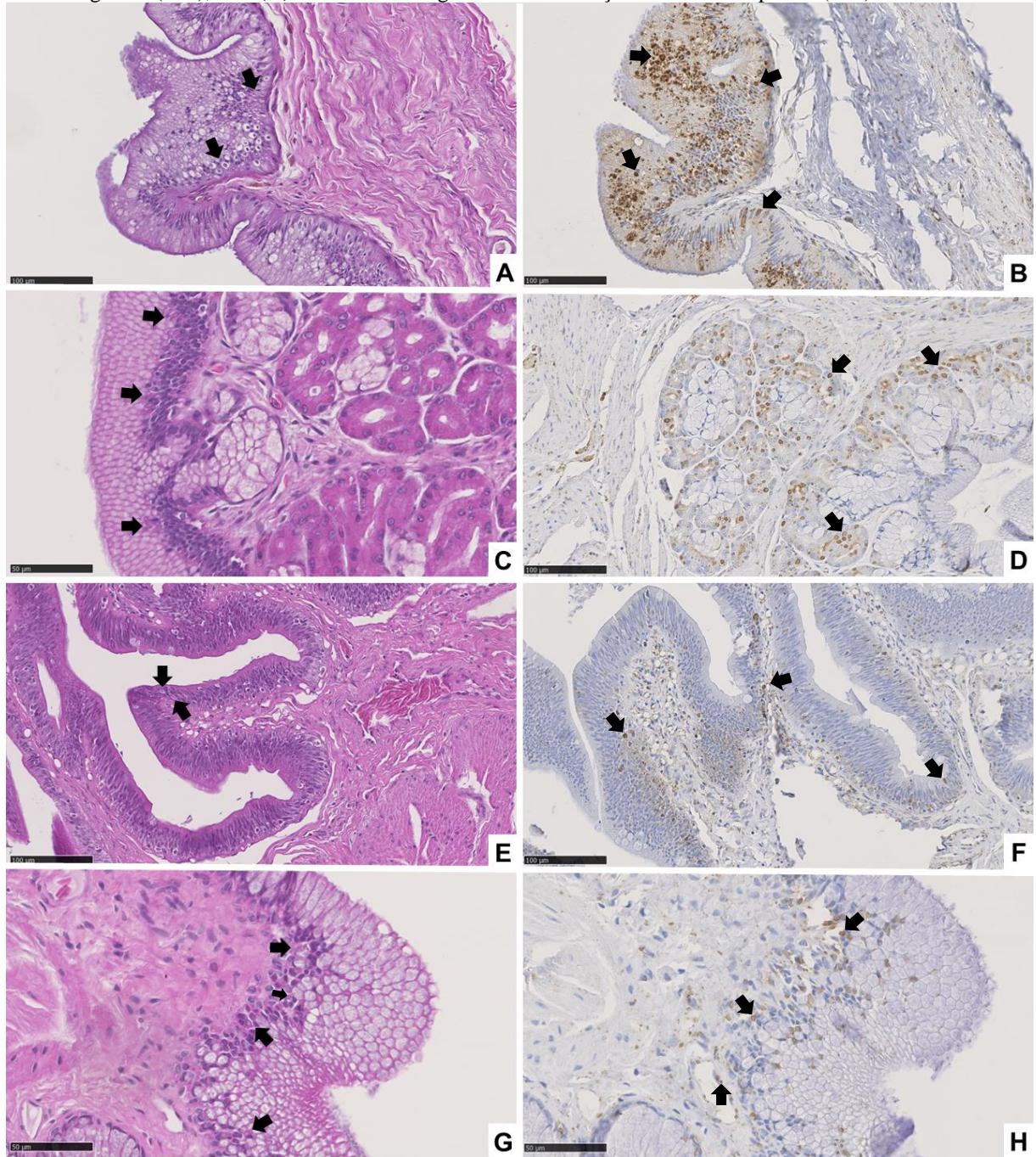
Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Figura 8 – Fotomicrografia histológica e imuno-histoquímica de um macho de *Epicrates cenchria* com hemangiossalcoma epitelial e hepático associado com BIBD e marcação positiva pra *Reptarenavírus* na imuno-histoquímica. (A) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em túbulos contorcidos proximais do rim (seta) associado a acúmulo de grânulos castanhos (ponta da seta), HE (B) IH do rim com marcação moderada (seta) e acúmulo de grânulos castanhos (ponta da seta). (C) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em adrenal (seta), HE. (D) IH da adrenal com marcação discreta (seta) (E) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em testículo (seta) associado a áreas de degeneração testicular (+) e fibrose (*), HE. (F) IH do testículo com marcação difusa (seta) e acúmulo de grânulos castanhos (ponta da seta). (G) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em epidídimos (seta), HE. (H) IH do epidídimos com marcação acentuado (seta).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Figura 9 – Fotomicrografia histológica e imuno-histoquímica de um macho de *Epicrates cenchria* com hemangiossarcoma epitelial e hepático associado com BIBD e marcação positiva pra *Reptarenavírus* na imuno-histoquímica. (A) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em esôfago (seta), HE (B) IH do esôfago com marcação acentuada em epitélio (seta). (C) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em estomago (seta), HE. (D) IH da estomago com marcação moderada em camada epitelial e glandular (seta) (E) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em intestino delgado (seta), HE. (F) IH do intestino delgado com marcação discreta em epitélio (seta). (G) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em intestino grosso (seta), HE. (H) IH do intestino grosso com marcação discreta em epitélio (seta).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

5.5 DISCUSSÃO

De acordo com nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que descreve hemangiossarcoma na forma cutânea e hepática em serpentes. Além disso, é o primeiro a descrever múltiplos nódulos de hemangiossarcoma com metástase em serpentes, bem como a associar a presença de hemangiossarcoma em serpentes com a presença de BIBD e com marcação para *Reptarenavírus* em imuno-histoquímica. Até o presente estudo, o hemangiossarcoma em serpentes foi descrito apenas duas vezes, na forma de nódulo único e sólido em coração, de uma *Leioheterodon madagascariensis* de 23 anos, e em baço, de uma *Pantherophis guttatus* adulta sem idade confirmada (TUTTLE *et al.*, 2006; SHOEMAKER *et al.*, 2016).

Os resultados revelaram que os machos foram mais afetados pelo hemangiossarcoma, representando 69% dos animais afetados, entretanto, é possível que esse dado esteja diretamente ligado ao maior número de machos vivos acima de 14 anos, uma vez que todos os animais acima de 14 anos apresentaram hemangiossarcoma. Além disso, a idade média dos animais afetados foi de $14,7 \pm 0,95$ anos. Esses achados estão em concordância com a literatura, que relata predominância do hemangiossarcoma em animais idosos (HARGIS *et al.*, 1992; CLIFFORD *et al.*, 2001; SMITH, 2003; FLORES *et al.*, 2012; KUSEWITT, 2013; FERNANDES e NARDI, 2016).

A forma visceral do hemangiossarcoma é mais prevalente do que a forma cutânea. Um estudo retrospectivo realizado por Schultheiss (2004) observou 68% de hemangiossarcoma visceral e 32% não visceral. No entanto, no presente estudo, não foi possível determinar se a neoplasia visceral é mais prevalente do que a forma cutânea. Isso ocorreu devido ao fato de que todos os animais submetidos à necropsia apresentaram tanto a forma visceral quanto a forma cutânea, impossibilitando a definição do local primário da neoplasia. Além disso, nos animais não submetidos à necropsia, não foram realizados exames complementares para confirmar a presença do hemangiossarcoma na forma visceral.

Quanto à origem das neoplasias, elas são associadas a vários fatores, podendo ser genético, desequilíbrio hormonal, mutações celulares relacionadas à idade do animal e oncogenes virais (KUSEWITT, 2013; CHRISTMAN *et al.*, 2017). É importante observar que 54% dos animais são provenientes de diferentes locais e não possuem ligação genética, sendo descartada a possibilidade de predisposição genética para o desenvolvimento do hemangiossarcoma nesse caso em específico. Com exceção dos oncogenes virais, os outros fatores mencionados não estão ligados ao desenvolvimento específico de hemangiossarcoma em diversos animais de uma mesma população, o que torna o oncogene viral a principal

suspeita. O *Reptarenavírus* já foi descrito como associado a três neoplasias em serpentes: linfoma linfoblástico (SCHILLIGER *et al.*, 2015), linfoma de cólon e fibromixoma odontogênico (SIMARD *et al.*, 2020). Portanto, a presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos nos animais necropsiados e a marcação para *Reptarenavirus* na imuno-histoquímica do macho e inconclusão da presença de *Reptarenavirus* na fêmea e em uma das biópsias, reforçam a suspeita de seu envolvimento no desenvolvimento neoplásico.

Com relação a topografia dos nódulos cutâneos, a maior parte estar localizada na região ventral (69%), está de acordo com o que é descrito em cães, espécie mais afetada pelo hemangiossarcoma (HARGIS *et al.*, 1992; CLIFFORD; MACKIN; HENRY, 2000), entretanto, o desenvolvimento de hemangiossarcoma ventral em cães pode estar relacionado a irradiação solar (SMITH, 2003; SZIVEK *et al.*, 2012), fator não presente nos animais estudados, visto que são de cativeiro.

A presença de múltiplos nódulos de hemangiossarcoma em todos os animais difere do que é descrito para hemangiossarcoma em serpentes (TUTTLE *et al.*, 2006; SHOEMAKER *et al.*, 2016) e, de estudos pregressos, que descrevem que 72% dos cães apresentam nódulos cutâneos únicos (WARD *et al.*, 1994; SZIVEK *et al.*, 2012).

Em três animais foram identificadas lesões cicatriciais de remoção cirúrgica de nódulos suspeitos de hemangiossarcoma, porém, não foram realizadas análises histopatológicas. A recorrência do hemangiossarcoma cutâneo está presente em 77% dos casos (SZIVEK *et al.*, 2012), desse modo, é possível sugerir que os nódulos identificados nos três animais podem ser recidivas de nódulos previamente removidos.

Considerando o arranjo histológico e a correlação com o grau de diferenciação (SABATTINI *et al.*, 2009), foi observado que 50% dos animais possuíam alto grau de diferenciação das neoplasias, 37,5% grau moderado e 12,5% baixo grau de diferenciação. Entretanto estudos apontam não encontraram diferenciação com relação a sobrevida dos animais levando em consideração o grau de diferenciação (NOBREGA *et al.*, 2019). O presente estudo não conseguiu fazer tal correlação visto que não ocorreram óbitos até o atual momento.

Com relação a morfologia e núcleo das células dos nódulos cutâneos, todos os nódulos apresentaram células fusiformes a alongadas ou poliédricas, com núcleos arredondados, centrais e com cromatina densa, além de nucléolos inconsípicio a evidente e citoplasma pouco a moderadamente delimitado e escasso a moderada quantidade, sendo coerente com a literatura (SHOEMAKER *et al.*, 2016; NOBREGA *et al.*, 2019; BEAUMIER *et al.*, 2020).

A resposta do organismo diante do desenvolvimento da neoplasia é o aumento da produção de células inflamatórias locais, levando a presença de infiltrado inflamatório. Esse

infiltrado pode ser heterofílico ou linfoplasmocitário (DIETZ *et al.*, 2016; HECKERS *et al.*, 2012; KAO *et al.*, 2016; MARTINEZ *et al.*, 2016; TAGGART *et al.*, 2021). Além disso, o desenvolvimento de necrose também está descrito em associação com neoplasias em répteis (DIETZ *et al.*, 2016; TAGGART *et al.*, 2021). A hiperqueratose paraqueratótica, espongiose e acantose encontradas nos nódulos de pele coincidem com os três animais que estavam em ecdise no momento da coleta do material, sugerindo uma possível relação com o momento da muda.

Os animais que foram eutanasiados apresentavam anorexia, regurgitação, apatia e emagrecimento progressivo. Embora esses sinais clínicos sejam inespecíficos, eles são comumente descritos em animais com BIBD, assim como a ausência de sinais neurológicos, que é uma característica marcante da doença (WOZNIAK *et al.*, 2000; VANCRAEYNEST *et al.*, 2006; CHANG; JACOBSON, 2010; ARGENTA *et al.*, 2020), embora descrita recentemente como transitória em alguns casos (HETZEL *et al.*, 2021)

As características do hemangiossarcoma descrito no fígado dos animais necropsiados, como coloração, consistência, arranjo celular, características nucleares, presença de nucléolo e citoplasma, bem como o número de mitoses, são semelhantes às descritas para hemangiossarcoma em outras espécies (DARBY; NTAVLOUROU, 2006; MEJÍA *et al.*, 2009; SHOEMAKER *et al.*, 2016; NÓBREGA *et al.*, 2019; BEAUMIER *et al.*, 2020). Além disso, a proliferação moderada a acentuada de melanomacrófagos em animais ectotérmicos pode estar associada à presença de lesões e neoplasias (KRANZ; PETERS, 1984; BORUCINSKA; HARSHBARGER; BOGICEVIC, 2003; GYIMESI *et al.*, 2004; ABDEL-MONEIM; AL-KAHTANI; ELMENSHAWY, 2012), assim como, degeneração hepática observada nos animais necropsiados pode estar relacionada à BIBD (SCHUMACHER *et al.*, 1994; RAYMOND *et al.*, 2001; VANCRAEYNEST *et al.*, 2006; TURCHETTI *et al.*, 2013).

Quanto aos granulomas encontrados no fígado, subcutâneo, cranial ao rim e no pulmão da fêmea, foi realizada a coloração de Ziehl Neelsen, e não foi detectada a presença de bacilos álcool-ácido resistentes, descartando a possibilidade de infecção por *Mycobacterium*. Granulomas com essa descrição são comumente observados em serpentes associados a agentes bacterianos, como *Salmonella* (FORNAZARI; TEIXEIRA, 2009; DE SOUZA *et al.*, 2014; BERTOLINI *et al.*, 2021). No entanto, no presente estudo, não foi possível realizar a confirmação do agente causador dos granulomas.

No nódulo presente no estômago da fêmea, foi utilizada a coloração de Tricrômico de Masson, que resultou em uma coloração avermelhada das células neoplásicas, diagnosticando o nódulo como leiomiossarcoma, já relatado anteriormente em serpentes (CATÃO-DIAS, NICHOLS, 1999; VASARUCHAPONG *et al.*, 2019).

A presença de corpúsculos de inclusão nos animais necropsiados foi achado durante a histopatologia, uma vez que os animais não apresentavam os principais sinais clínicos característicos da doença, como sinais neurológicos. No entanto, no início do estudo, havia suspeita de que pudesse haver algum vírus predispondo a formação da neoplasia. A BIBD já foi descrita em animais que, posteriormente ao diagnóstico, desenvolveram algum tipo de neoplasia, e o *Reptarenavirus* já foi isolado em tecidos neoplásicos, comprovando sua associação com neoplasias (SCHILLIGER *et al.*, 2015; SIMARD *et al.*, 2020). Isso levanta a questão de um possível envolvimento do vírus na formação dos hemangiossarcomas.

Os locais nos quais os corpúsculos de inclusão foram encontrados já haviam sido relatados anteriormente como possíveis focos da doença (HETZEL *et al.*, 2013; HEPOJOKI *et al.*, 2015; SCHILLIGER *et al.*, 2015; STENGLIN *et al.*, 2017; HYNDMAN *et al.*, 2019; SIMARD *et al.*, 2020; ALFARO-ALARCÓN *et al.*, 2022). A classificação inconclusiva da imuno-histoquímica do fígado da fêmea deve-se à alta degeneração hepática e à presença elevada de melanomacrófagos, o que impossibilitou a diferenciação da marcação. No entanto, a presença dos corpúsculos de inclusão suscita a suspeita de positividade. Quanto à classificação inconclusiva da imuno-histoquímica na biópsia do animal 1, houve marcação elevada no citoplasma das células, porém sem a presença de corpúsculos de inclusão. No entanto, o outro fragmento de biópsia foi totalmente negativo na imuno-histoquímica, o que faz inferir que a biópsia 1 possa ser positiva.

5.6 CONCLUSÃO

Através deste estudo, foi possível descrever a anátomo-histopatologia e macroscopia de múltiplos nódulos cutâneos e hepáticos de hemangiossarcoma em uma população de *Epicrates cenchria* (Jiboia Arco-íris), sendo observada uma maior presença da lesão cutânea em região ventral das serpentes, predominantemente na forma de máculas e avermelhadas. Já a forma visceral da neoplasia, foi observada exclusivamente em fígado. Também, foi identificado animais que apresentaram BIBD e marcação para *Reptarenavirus* na imuno-histoquímica, sugerindo a relação entre o desenvolvimento neoplásico e o vírus. Entretanto, para comprovar tal afirmação, sugere-se novos estudos que identifiquem o vírus em todos os animais com hemangiossarcoma e isolem o vírus em tecido neoplásico.

5.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) EDITAL DE CHAMADA PÚBLICA FAPESC Nº 048/2022 APOIO À INFRAESTRUTURA PARA GRUPOS DE PESQUISA DA UDESC (FAPESC 048/2022 – Nº 2023TR557).

5.8 REFERÊNCIAS

- ABDEL-MONEIM, Ashraf M.; AL-KAHTANI, Mohamed A.; ELMENSHAWY, Omar M. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. **Chemosphere**, [s. l.], v. 88, n. 8, p. 1028–1035, 2012.
- ALFARO-ALARCON, Alejandro *et al.* Boid Inclusion Body Disease Is Also a Disease of Wild Boa Constrictors. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 10, n. 5, 2022.
- ARGENTA, Fernando Froner *et al.* Identification of Reptarenaviruses, Hartmaniviruses, and a Novel Chuvirus in Captive Native Brazilian Boa Constrictors with Boid Inclusion Body Disease. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 94, n. 11, 2020.
- BATSCHEINSKI, Karen *et al.* Canine visceral hemangiosarcoma treated with surgery alone or surgery and doxorubicin: 37 cases (2005–2014). **The Canadian Veterinary Journal**, v. 59, n. 9, p. 967, 2018.
- BEAUMIER, Amelie *et al.* Primary cardiac hemangiosarcoma in a horse: echocardiographic and necropsy findings. **Journal of Veterinary Cardiology**, [s. l.], v. 32, p. 66–72, 2020.
- BERTOLINI, Marianna *et al.* Pathological and Microbiological Findings in Fatal Cases of Salmonellosis in Captive Bothrops Snakes in Southern Brazil. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 186, p. 7–12, 2021.
- BORUCINSKA, Joanna D.; HARSHBARGER, J. C.; BOGICEVIC, T. Hepatic cholangiocarcinoma and testicular mesothelioma in a wild-caught blue shark, *Prionace glauca* (L.). **Journal of Fish Diseases**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 43–49, 2003.
- BURRI, Dominique J. *et al.* Envelope glycoprotein of arenaviruses. **Viruses**, v. 4, n. 10, p. 2162–2181, 2012.
- CATÃO-DIAS, José Luiz; NICHOLS, D. K. Neoplasia in snakes at the National Zoological Park, Washington, DC (1978–1997). 1999.
- CHANG, Li Wen; JACOBSON, Elliott R. Inclusion body disease, a worldwide infectious disease of boid snakes: A review. **Journal of Exotic Pet Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 216–225, 2010.
- CHOORAPOIKAYIL, Suma *et al.* Haploinsufficiency of the genes encoding the tumor suppressor Pten predisposes zebrafish to hemangiosarcoma. **DMM Disease Models and Mechanisms**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 241–247, 2012.
- CHRISTMAN, Jane *et al.* Oncology of reptiles: diseases, diagnosis, and treatment. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 87–110, 2017.
- CLIFFORD, Craig A. *et al.* Plasma vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs and dogs with hemangiosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 131–135, 2001.
- CLIFFORD, Craig A.; MACKIN, Andrew J.; HENRY, Carolyn J. Treatment of canine hemangiosarcoma: 2000 and beyond. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 5, p. 479–485, 2000.

- CULLEN, J. M.; PAGE, R.; MISDORP, W. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis, and management. **Tumors in domestic animals**, [s. l.], p. 3–44, 2002.
- DARBY, Carl; NATAVLOUROU, Vasiliki. Hepatic hemangiosarcoma in two ferrets (*Mustela putorius furo*). **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 9, n. 3, p. 689–694, 2006.
- DE SOUZA, Suyene O. *et al.* Osteomyelitis caused by *salmonella enterica* serovar derby in boa constrictor. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 642–644, 2014.
- DIETZ, J. *et al.* Cutaneous and Subcutaneous Soft Tissue Tumours in Snakes: A Retrospective Study of 33 Cases. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 155, n. 1, p. 76–87, 2016.
- ESCHLI, Bruno *et al.* Identification of an N-Terminal Trimeric Coiled-Coil Core within Arenavirus Glycoprotein 2 Permits Assignment to Class I Viral Fusion Proteins. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 80, n. 12, p. 5897–5907, 2006.
- FERNANDES, S. C.; NARDI, A. B. De. Hemangiossarcomas. In: DALECK, C. R.; NARDI, A. B. De. **Oncologia em cães e gatos**. 2. ed. rev. [S. l.]: Roca, 2016. cap. 42, p. 776–796.
- FLORES, Mariana M. *et al.* Aspectos epidemiológicos e anatomo-patológicos do hemangiossarcoma em cães: 40 casos (1965-2012). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 1319–1328, 2012.
- FORNAZARI, Felipe; TEIXEIRA, Carlos Roberto. Salmonelose em répteis: Aspectos epidemiológicos, clínicos e zoonóticos. **Veterinária e Zootecnia**, p. 19–25, 2009.
- FRYE, F. L. Diagnosis and surgical treatment of reptilian neoplasms with a compilation of cases 1966-1993. **In Vivo (Athens, Greece)**, v. 8, n. 5, p. 885–892, 1994.
- GARNER, M. M.; HERNANDEZ-DIVERS, S. M.; RAYMOND, J. T. Reptile neoplasia: a retrospective study of case submissions to a specialty diagnostic service. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 7, n. 3, p. 653–671, 2004.
- GYIMESI, Zoltan S.; HOWERTH, Elizabeth W. Severe melanomacrophage hyperplasia in a crocodile lizard, *Shinisaurus crocodilurus*: a review of melanomacrophages in ectotherms. **Journal of Herpetological Medicine and Surgery**, v. 14, n. 1, p. 19–23, 2004.
- HARGIS, A. M. *et al.* A retrospective clinicopathologic study of 212 dogs with cutaneous hemangiomas and hemangiosarcomas. **Veterinary Pathology**, v. 29, n. 4, p. 316–328, 1992.
- HECKERS, K. O. *et al.* Melanophoromas and Iridophoromas in Reptiles. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 146, n. 2–3, p. 258–268, 2012.
- HEPOJOKI, J. *et al.* Arenavirus Coinfections Are Common in Snakes with Boid Inclusion Body Disease. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 89, n. 16, p. 8657–8660, 2015.
- HETZEL, U. *et al.* Experimental Reptarenavirus Infection of Boa constrictor and *Python regius*. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 95, n. 7, 2021.
- HETZEL, Udo *et al.* Isolation, Identification, and Characterization of Novel Arenaviruses, the Etiological Agents of Boid Inclusion Body Disease. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 87, n. 20, p. 10918–10935, 2013.

- HEVEZI, PETER; GOFF, STEPHEN P. Generation of recombinant murine retroviral genomes containing the v-src oncogene: Isolation of a virus inducing hemangiosarcomas in the brain. **Journal of virology**, v. 65, n. 10, p. 5333-5341, 1991.
- HYNDMAN, T. H. *et al.* Reptarenaviruses in apparently healthy snakes in an Australian zoological collection. **Australian Veterinary Journal**, [s. l.], v. 97, n. 4, p. 93–102, 2019.
- KAO, Chi Fei *et al.* A renal adenocarcinoma in a corn snake (*Pantherophis guttatus*) resembling human collecting duct carcinoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 599–603, 2016.
- KRANZ, H.; PETERS, N. Melano-macrophage centres in liver and spleen of ruffe (*Gymnocephalus cernua*) from the Elbe Estuary. **Helgoländer Meeresuntersuchungen**, v. 37, p. 415-424, 1984.
- KUSEWITT, D. F. Neoplasia e Biologia Tumoral. In: MCGAVIN, M. Donald *et al.* **Bases da patologia em veterinária**. 5. ed. [S. l.]: Elsevier Editora Ltda, 2013. cap. 6, p. 733-813.
- MAES, Piet *et al.* Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 163, n. 8, p. 2295–2310, 2018.
- MARTINEZ, Salutario J. *et al.* Angiomatoid fibrous histiocytoma: novel MR imaging findings. **Skeletal Radiology**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 661–670, 2016.
- MEJÍA, A. F. *et al.* Pediatric hepatic hemangiosarcoma in a rhesus macaque (*Macaca mulatta*). **Journal of Medical Primatology**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 121–124, 2009.
- MORGAN, John C.; MAJORS, John E.; GALILEO, Deni S. Distinct and opposite roles for SH2 and SH3 domains of v-src in embryo survival and hemangiosarcoma formation. **Clinical and Experimental Metastasis**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 167–175, 2005.
- NÓBREGA, D. F. *et al.* Canine Cutaneous Haemangiosarcoma: Biomarkers and Survival. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 166, p. 87–96, 2019.
- OWEN, Laurence Nightingale *et al.* **TNM Classification of Tumours in Domestic Animals/edited by LN Owen**. World Health Organization, 1980.
- PAGE-KARJIAN, A. *et al.* Neoplasia in snakes at Zoo Atlanta during 1992– 2012. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 48, n. 2, p. 521-524, 2017.
- PONTREMOLI, Chiara *et al.* Analysis of Reptarenavirus genomes indicates different selective forces acting on the S and L segments and recent expansion of common genotypes. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 64, p. 212–218, 2018.
- RADOSHITZKY, Sheli R. *et al.* Receptor determinants of zoonotic transmission of New World hemorrhagic fever arenaviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 7, p. 2664-2669, 2008.
- RAYMOND, James T. *et al.* A disease resembling inclusion body disease of boid snakes in captive palm vipers (*Bothriechis marchi*). **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 13, n. 1, p. 82-86, 2001.

- SABATTINI, S.; BETTINI, G. An Immunohistochemical Analysis of Canine Haemangioma and Haemangiosarcoma. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 140, n. 2-3, p. 158-168, 2009.
- SCHILLIGER, Lionel *et al.* Antemortem diagnosis of multicentric lymphoblastic lymphoma, lymphoid leukemia, and inclusion body disease in a boa constrictor (Boa constrictor imperator). **Journal of Herpetological Medicine and Surgery**, v. 24, n. 1-2, p. 11-19, 2014.
- SCHULTHEISS, Patricia C. A retrospective study of visceral and nonvisceral hemangiosarcoma and hemangiomas in domestic animals. **Journal of Veterinary diagnostic investigation**, v. 16, n. 6, p. 522-526, 2004.
- SCHUMACHER, Juergen *et al.* Inclusion body disease in boid snakes. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, p. 511-524, 1994.
- SHOEMAKER, Margaret *et al.* Pathology in practice. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 248, n. 2, p. 153-155, 2016.
- SIMARD, Jules *et al.* Prevalence of inclusion body disease and associated comorbidity in captive collections of boid and pythonid snakes in Belgium. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 3, 2020.
- SMITH, Annette N. Hemangiosarcoma in dogs and cats. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 533-552, 2003.
- STENGLEIN, Mark D. *et al.* Differential Disease Susceptibilities in Experimentally Reptarenavirus-Infected Boa Constrictors and Ball Pythons. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 91, n. 15, 2017.
- SYKES, J. M.; TRUPKIEWICZ, J. G. Reptile neoplasia at the Philadelphia zoological garden, 1901-2002. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 37, n. 1, p. 11-19, 2006.
- SZIVEK, A. *et al.* Clinical outcome in 94 cases of dermal haemangiosarcoma in dogs treated with surgical excision: 1993-2007. **Veterinary and Comparative Oncology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 65-73, 2012.
- TAGGART, Patrick L. *et al.* Cutaneous Chromatophoromas in Four Species of Australian Elapid Snake. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 183, p. 33-38, 2021.
- TURCHETTI, Andréia Pereira *et al.* Inclusion body disease in a *Corallus hortulanus*. **Braz J Vet Pathol**, v. 6, n. 1, p. 15-18, 2013.
- TUTTLE, Allison D. *et al.* Splenic hemangiosarcoma in a corn snake, *Elaphe guttata*. **Journal of Herpetological Medicine and Surgery**, v. 16, n. 4, p. 140-143, 2006.
- VANCRAEYNEST, D. *et al.* Inclusion body disease in snakes: a review and description of three cases in boa constrictors in Belgium. **Veterinary record**, v. 158, n. 22, p. 757-761, 2006.
- VASARUCHAPONG, Taksa *et al.* Surgical Removal and Recurrence of Leiomyosarcoma in a King Cobra, *Ophiophagus hannah*. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 49, n. 1, p. 87-91, 2019.

WARD, Heidi *et al.* Cutaneous Hemangiosarcoma in 25 Dogs: A Retrospective Study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 345–348, 1994.

WOZNIAK, E. *et al.* Isolation and characterization of an antigenically distinct 68-kd protein from nonviral intracytoplasmic inclusions in Boa constrictors chronically infected with the inclusion body disease virus (IBDV: Retroviridae). **Veterinary pathology**, v. 37, n. 5, p. 449-459, 2000.

YONEMARU, Kayoko *et al.* The significance of p53 and retinoblastoma pathways in canine hemangiosarcoma. **Journal of veterinary medical science**, v. 69, n. 3, p. 271-278, 2007.

ZUCCARI, D. A. P. D.; NARDI, A. B. De. Biologia do Câncer. In: DALECK, Carlos Roberto; NARDI, Andrigo Barboza De. **Oncologia em cães e gatos**. 2. ed. rev. [S. l.]: Roca, 2016. cap. 2, p. 65-87.