

PRISCILLA BARTOLOMEU DE ARAÚJO

**MARCADORES TUMORAIS SÉRICOS E EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES
HORMONAIS EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS**

**RECIFE
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

PRISCILLA BARTOLOMEU DE ARAÚJO

**MARCADORES TUMORAIS SÉRICOS E EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES
HORMONAIIS EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

RECIFE
2016

Ficha catalográfica

A663m Araújo, Priscilla Bartolomeu de
Marcadores tumorais séricos e expressão gênica de receptores
hormonais em neoplasias mamárias caninas / Priscilla Bartolomeu
de Araújo. – Recife, 2016.
83 f.

Orientador(a): Joaquim Evêncio Neto.
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Medicina Veterinária, Recife, 2016.

Inclui apêndice(s) e referências.

1. Mamas – Câncer 2. Cão 3. Hormônios I. Evêncio Neto,
Joaquim, orientador II. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**MARCADORES TUMORAIS SÉRICOS E EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES
HORMONAIS EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS**

Tese de Doutorado elaborada por Priscilla Bartolomeu de Araújo

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto - Presidente
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Prof. Dra. Liriane Baratella Evêncio
Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE

Prof. Dra. Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Dra. Lígia Reis de Moura Estevão
PNPD/CAPES/UFRPE/DMFA

Prof. Dr. Fábio de Souza Mendonça
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Ao meu filho Pedro, luz dos meus olhos,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Professor Joaquim Evêncio Neto, pela orientação, compreensão e paciência durante os anos de execução deste trabalho. Serei sempre grata pelos frutos diretos e indiretos que esta pesquisa me trouxe, e que irei levar por toda vida. Muitíssimo obrigada.

À FACEPE, pela concessão da bolsa durante os primeiros anos do Doutorado.

À UFRPE, que me oportunizou diversos momentos de aprendizagem nesses últimos 15 anos, momentos estes que nortearam minha vida profissional e pessoal. Sou muito grata a esta casa e as pessoas que dela fazem parte, e, se assim me for permitido, continuarei aqui por muitos anos ainda.

Às amigas Ana Karina, Elisângela Silva e Marcela Sampaio pela imensa contribuição no momento da seleção das pacientes, e do acompanhamento clínico e cirúrgico: sem vocês a execução dessa pesquisa seria bem mais difícil!

À Professora Maria Cristina Cardoso Coelho, por toda disponibilidade, ajuda e apoio durante a realização dos procedimentos cirúrgicos, e em tantos outros momentos. A profissional que sou hoje é resultado também de tudo que pude aprender com a Senhora desde a graduação. Obrigada, hoje e sempre.

A todos os amigos do Hospital Veterinário da UFRPE, muitos contribuíram de alguma forma para que esta pesquisa se tornasse viável.

À amiga Maria Edna Barros, por toda ajuda e por tudo que aprendi com você. Pela disponibilidade que teve e ainda tem sempre que necessário. Obrigada é pouco por tudo que aprendi, e pelos resultados que isso me trouxe.

A todos os amigos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE.

A Mariana Rego e Lígia Estevão, por toda a ajuda antes, durante e após a qualificação.

Ao Professor Fábio Mendonça, pela ajuda com a interpretação dos resultados dos exames histopatológicos.

À Daniela Campinho, amiga, comadre e irmã, pela IMENSA contribuição direta e indireta. Obrigada por poder contar com você sempre!

Ao professor Pierre Castro Soares, orientador de ESO e de mestrado, e também a seus orientados Emanuel Felipe e, em especial, Daniel Nunes, pelos poucos (porém ótimos) momentos em que tivemos a oportunidade de trabalhar juntos. Muito obrigada pela ajuda, é difícil encontrar pessoas como vocês!

Ao Professor Manoel Adrião, pela ajuda e disponibilidade.

Ao amigo Diogo Manoel, sua contribuição foi imprescindível e de grande importância. Agradeço demais!

Aos colegas e amigos da Clínica de Bovinos de Garanhuns, por emprestarem ombros e ouvidos, por compreenderem as ausências. Agradeço ao Dr. Nivaldo de Azevedo Costa, pela compreensão que tornou viável a conclusão desta etapa.

Agradeço especialmente a Alexandre Mota, sempre ao meu lado, sempre me ajudando a encontrar soluções para as dificuldades que surgiram. Agradeço o companheirismo, o carinho, a lealdade, o cuidado. Obrigada!

Aos meus familiares, Manoel, Patrícia, Francinete e Marcone, por me apoiarem e me ajudarem imensamente em mais esta etapa.

A todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho acontecesse: muito obrigada! Hoje avanço mais um degrau em minha formação, e muitos foram os que tornaram possível esse avanço.

“... é o mesmo que acender um fósforo no campo no meio da noite.

*Um fósforo não ilumina quase nada,
mas nos permite ver quanta escuridão existe ao redor.”*

Willian Faulkner

Quanto mais se aprende, mais vemos que não sabemos de nada.

O ignorante é cheio de certezas.

MARCADORES TUMORAIS SÉRICOS E EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES HORMONAIS EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

RESUMO: Objetivou-se realizar um estudo clínico e histopatológico e investigar os níveis séricos de estradiol, progesterona e prolactina, e a expressão gênica dos receptores de estrógeno α e β , e de progesterona em cadelas portadoras de tumores mamários. Foram utilizadas 60 cadelas de diferentes idades e raças, sendo 30 cadelas portadoras de neoplasias mamárias e 30 cadelas híginas. Fragmentos do tumor foram coletados para realização do exame histopatológico, e para investigação da expressão gênica dos receptores hormonais. Coletou-se ainda amostras de soro para realização das dosagens hormonais séricas e de Ca15.3. As neoplasias malignas foram mais frequentes (76,7%), destacando-se o carcinosarcoma (36,7%). A frequência dos tumores benignos foi de 23,3%. As neoplasias mamárias foram em sua maioria múltiplas, maiores que 5 cm, localizadas nas mamas abdominais. Os tutores relataram que 56,7% das cadelas não apresentaram sinais de pseudociese, 63,3% não haviam passado por gestação anterior, 76,7% não haviam feito uso de anticoncepcionais, e 90% não haviam sido castradas. Quanto às dosagens séricas do marcador Ca15.3 não foi encontrada diferença quando comparadas as cadelas portadoras de neoplasias e cadelas híginas, ou quando comparados os demais grupos. As cadelas portadoras de neoplasias malignas apresentaram maiores níveis de estradiol e menores níveis de prolactina. Tanto os tumores malignos como os benignos expressaram receptores hormonais, não havendo diferença na expressão entre eles ou entre os outros fatores prognósticos. Os níveis séricos de estradiol aumentaram significativamente com o estadiamento clínico da doença. Verificou-se também moderada correlação negativa entre os níveis séricos de estradiol e prolactina. Conclui-se que a influência hormonal é evidente nos casos de neoplasias mamárias caninas, sobretudo dos estrógenos, que parecem estar mais associados às características de malignidade. Soma-se ainda a presença dos receptores hormonais, mesmo em tipos tumorais distintos, o que pode propor a utilização da terapia hormonal como alternativa. Já a dosagem de Ca15.3 não mostrou resultados que tornassem possível sua utilização como ferramenta para acompanhamento e avaliação das pacientes.

PALAVRAS-CHAVE: Ca15.3, estrógeno, estradiol, prolactina, progesterona, receptores hormonais.

SERUM TUMOR MARKERS AND GENE EXPRESSION OF HORMONE RECEPTORS IN CANINE MAMMARY NEOPLASMS

ABSTRACT: The present objective was to perform a clinical and histopathological study to investigate the serum levels of estradiol, progesterone and prolactin, as well as the gene expression of the estrogen receptors α and β , and progesterone in bitches with mammary tumors. Sixty bitches of various ages and breeds were selected: 30 with mammary neoplasia and 30 healthy bitches. Fragments of the tumors were collected for histopathology and for investigation of the gene expression of the hormone receptors. Serum samples were also collected for measurement of serum hormones and Ca15.3. Malignant neoplasms were more frequent (76.6%), with a greater number of carcinosarcomas (36.7%). The frequency of benign tumors was 23.3%. Mammary tumors were mostly multiple, larger than 5 cm, and located in the abdominal mammary glands. Owners reported that most dogs had not shown signs of pseudocyesis, had not had a prior pregnancy, nor had they used contraceptives or been spayed. Regarding serum concentrations of the Ca15.3 marker, there was no difference when comparing bitches with neoplasia and healthy bitches, or when comparing the other groups. Bitches with malignant neoplasms had higher levels of estradiol and lower levels of prolactin. Both malignant and benign neoplasms expressed hormone receptors, and there was no difference in expression between them. There was also no difference in prognostic factors between groups. Serum levels of estradiol increased significantly with clinical staging of the disease. There was also a moderate negative correlation between serum levels of estradiol and prolactin. It is concluded that the hormonal influence is evident in cases of canine mammary neoplasms, especially estrogens, which seem to be most associated with malignant characteristics. The influence of hormones is reinforced by the presence of hormone receptors even in different tumor types, which could suggest the use of hormone therapy as an alternative. However, quantification of Ca15.3 did not show any results that made its use possible as a tool for patient monitoring and evaluation.

KEYWORDS: Ca15.3, estrogen, estradiol, prolactin, progesterone, hormone receptors.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.	Estadiamento clínico das neoplasias mamárias caninas.	21
Quadro 2.	Classificação das neoplasias mamárias caninas, segundo Cassali et al. (2011).	23
 ARTIGO 1		
Tabela 1	Frequências dos tipos histológicos em cadelas portadoras de neoplasias mamárias.	49
Tabela 2	Frequências absoluta e relativa das características clínicas observadas em cadelas portadoras de neoplasias mamárias.	51
Tabela 3	Análise univariada dos fatores associados ao tipo de tumor (maligno e benigno).	54
 ARTIGO 2		
Quadro 1	Estadiamento clínico das neoplasias mamárias caninas.	63
Quadro 2	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no PCR em tempo real para amplificação dos genes RE α , RE β , PR e GAPDH.	64
Quadro 3	Frequência dos tipos histológicos em cadelas portadoras de neoplasias mamárias.	65
Quadro 4	Comparação entre os resultados das variáveis analisadas pelo tipo de tumor	66
Quadro 5	Comparação entre os ranks médios dos resultados das variáveis analisadas pelo estadiamento.	67
Quadro 6	Comparação entre os ranks médios dos resultados das variáveis analisadas pelo tempo de evolução.	68
Quadro 7	Comparação entre os ranks médios dos resultados das variáveis analisadas pela presença de ulceração.	68
Quadro 8	Comparação entre os ranks médios dos resultados das variáveis analisadas pela presença de vascularização.	69
Quadro 9	Análise de correlação das variáveis pelos grupos (maligno, benigno e controle) através do teste de Spearman.	69

ARTIGO 3

Tabela 1	Estadiamento clínico das neoplasias mamárias caninas	76
Tabela 2	Frequência dos tipos histológicos em cadelas portadoras de neoplasias mamárias;	77
Tabela 3	Comparação entre os resultados das variáveis analisadas pelo tipo de tumor.	78
Tabela 4	Comparação entre os ranks médios dos resultados das variáveis analisadas pelo estadiamento.	78
Tabela 5	Comparação entre os ranks médios dos resultados das variáveis analisadas pelo tempo de evolução.	78
Tabela 6.	Comparação entre os ranks médios dos resultados das variáveis analisadas pela presença de ulceração.	78
Tabela 7	Comparação entre os ranks médios dos resultados das variáveis analisadas pela vascularização.	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 17-E2 – estradiol
- Ca15.3 – antígeno do câncer 15.3
- CEUA – Comitê de ética no uso de animais
- DMFA – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
- EGF – fator de crescimento epidermal
- GH – hormônio do crescimento
- IGF-I – Fator de crescimento semelhante à insulina I
- M0 – Não há metástases à distância
- M1 – presença de metástases à distância
- N0 – características histológicas do linfonodo normais
- N1 – linfonodo positivo ipsilateral
- N2 – linfonodos bilaterais positivos
- OH – ovariectomia
- OMS – Organização mundial de saúde
- OSH – ovariectomia com salpingo-ovariectomia
- PRL – prolactina
- RE – receptor de estrógeno
- RE α – receptor de estrógeno α
- RE β – receptor de estrógeno β
- RP – receptor de progesterona
- SRD – Sem raça definida
- T0 – sem evidência de tumor
- T1 – tumor menor que 3 cm de diâmetro
- T2 – tumor com tamanho entre 3 e 5 cm
- T3 – tumor maior que 5 cm
- T4- carcinoma inflamatório
- TGF – fator de crescimento tumoral
- TNM – tumor-linfonodo-metástase

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3.	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	Neoplasias mamárias caninas	18
3.2	Influência hormonal na oncogênese	26
3.3	Marcadores tumorais em neoplasias mamárias caninas	29
3.3.1	Marcador Ca15.3	29
3.3.2	Estrógeno	30
3.3.3	Progesterona	32
3.3.4	Prolactina	33
4.	REFERÊNCIAS	35
5.	ARTIGOS	
5.1	ARTIGO 1 – Caracterização clínica e histopatológica de neoplasias mamárias em cadelas	44
5.2	ARTIGO 2 – Dosagens séricas hormonais e expressão gênica de RE e RP em cadelas portadoras de neoplasias mamárias	60
5.3	ARTIGO 3 – Dosagem sérica do marcador tumoral Ca 15.3 em cadelas portadoras de neoplasias mamárias pelo método de eletroquimioluminescência	73
6.	APÊNDICE A – Ficha clínica das pacientes	82

1. INTRODUÇÃO

Os tumores mamários são comuns em cães, tendo sido relatada uma frequência superior a 50% nas fêmeas caninas (QUEIROGA & LOPES, 2002; OLIVEIRA et al., 2003, OLIVEIRA FILHO et al., 2010, FELICIANO et al., 2012). Dada à frequência com que surgem na rotina veterinária e importância que os cães possuem como animais de companhia, o estudo das neoplasias mamárias caninas ganha destaque na clínica veterinária (FONSECA & DALECK, 2000).

As neoplasias mamárias caninas têm sido muito investigadas, principalmente por servir de modelo para o estudo do câncer de mama na mulher, uma vez que possuem características epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas semelhantes as da espécie humana (PELETEIRO, 1994). São considerados aspectos biologicamente semelhantes nos estudos comparativos do câncer de mama humano e canino o aspecto morfológico, a origem no sistema ductal, os órgãos alvos de metástases, a evolução clínica das neoplasias, a faixa etária de aparecimento, o efeito protetor da ovariectomia e a presença de receptores hormonais (CAVALCANTI & CASSALI, 2006). Por esse motivo, os tumores mamários caninos se mostram como um importante modelo para investigação experimental do processo neoplásico em humanos.

A transformação neoplásica é multifatorial e dentre os fatores envolvidos na oncogênese estão incluídos a origem viral, influência da dieta e obesidade, componentes genéticos e principalmente a influência hormonal (PELETEIRO, 1994; FONSECA & DALECK, 2000). Soma-se ainda à origem multifatorial, a grande diversidade morfológica dos tumores mamários, que dificulta a sua classificação e confere aos tumores mamários um comportamento biológico inesperado. Nesse sentido, o estudo de marcadores tumorais têm alcançado grande progresso nos últimos anos. Com o avanço da biologia molecular surgem perspectivas no estudo de novos marcadores prognósticos, visando a prevenção, diagnóstico precoce e tratamentos mais eficazes. Investigações têm como proposta a utilização desses marcadores no auxílio a detecção precoce de recidivas, e acompanhamento do animal durante o tratamento quimioterápico, contribuindo para uma melhor avaliação da evolução da doença (CAMPOS et al., 2012).

Alguns estudos vêm apontando novos marcadores tumorais no âmbito da biologia molecular, que buscam a prevenção, diagnóstico precoce e tratamento mais eficazes (CASSALI et al., 2007). Nesse sentido, a detecção de receptores hormonais em tumores de mama possui valor tanto prognóstico como terapêutico, e vem sendo apontada em diversos

trabalhos (COSTA et al., 1998; DEPES et al., 2003; HELGUERO et al., 2008; RAMOS et al., 2012). Nos tumores mamários caninos, através da técnica de imunohistoquímica e PCR, são detectados receptores de estrógeno e progesterona em diferentes proporções a depender dos tipos tumorais estudados. A presença dos receptores hormonais comumente está mais associada a neoplasias benignas ou a neoplasias malignas melhor diferenciadas, ou seja, a processos com melhor prognóstico, apresentando uma opção de conduta terapêutica e indicando também um importante campo de estudo na oncologia veterinária.

Em seres humanos, a utilização de marcadores tumorais faz parte da rotina das pacientes portadoras de neoplasias mamárias. Para que estes marcadores sejam considerados ideais, eles devem refletir a extensão do tumor, a resposta ao tratamento e a progressão da doença (JACOBS & HASKELL, 1991). Analisado em conjunto com a anamnese e resultados dos demais exames, o marcador pode trazer informações importantes para escolha da terapia e acompanhamento da evolução clínica do paciente. Dentre os marcadores de utilização consagrada na rotina oncológica humana, destacamos o CA15.3, uma proteína considerada como a mais sensível no acompanhamento de mulheres, sobretudo na detecção precoce de metástases (BICALHO, 2012). Contudo, em medicina veterinária, os estudos sobre a utilização de CA15.3 em cadelas portadoras de neoplasias mamárias ainda são escassos, e apresentam resultados conflitantes (JARDINI, 2003; BICALHO, 2012; CAMPOS et al., 2012; MANUALI et al., 2012).

Diante do exposto, afirma-se que o conhecimento do processo neoplásico e dos fatores que a ele estejam relacionados através da investigação dos marcadores tumorais e do papel hormonal na carcinogênese é de fundamental importância para instituição do diagnóstico, prognóstico e escolha terapêutica adequada, o que traz impactos diretos sobre a qualidade e tempo de sobrevivência das pacientes. Nesse sentido, a demonstração de parâmetros clínicos e patológicos que possuam significado clínico e terapêutico é um promissor campo de estudo. Contudo, apesar dos vários estudos que vêm sendo realizados, muitos aspectos permanecem ainda mal compreendidos. Assim, o presente trabalho tem como objetivo contribuir no estabelecimento de melhor conduta clínica, bem como no auxílio diagnóstico e do prognóstico precoce da neoplasia mamária em cadelas através da avaliação dos níveis séricos dos marcadores tumorais: estradiol, progesterona, prolactina e CA15.3 e da expressão gênica dos receptores de estrógeno e progesterona e do papel que estes assumem na oncogênese mamária canina.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Caracterizar clínica e histologicamente os casos de neoplasias mamárias em cadelas, e avaliar os níveis séricos de estradiol, progesterona, prolactina e de CA15.3 no soro de cadelas portadoras de neoplasias mamárias, e a expressão gênica dos receptores de estrógeno α e β e receptor de progesterona no tecido mamário neoplásico de cadelas.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar as frequências dos tipos histológicos de neoplasias mamárias em cadelas;
- Investigar a presença de metástases em linfonodos de cadelas portadoras de neoplasias mamárias;
- Investigar as frequências das neoplasias mamárias em cadelas, e dos fatores de risco a elas relacionados, como pseudociese, realização de OSH, alimentação, uso de anticoncepcionais;
- Avaliar os níveis séricos de estradiol, progesterona e prolactina, relacionando-os ao tipo tumoral e a outros fatores prognósticos clássicos, como estadiamento clínico, tempo de evolução, presença de ulceração e de vascularização;
- Avaliar os níveis séricos do marcador tumoral Ca15.3, relacionando-os ao tipo tumoral e a outros fatores prognósticos clássicos, como estadiamento clínico, tempo de evolução, presença de ulceração e de vascularização;
- Avaliar a expressão gênica dos receptores de estrógeno α e β e receptor de progesterona no tecido mamário neoplásico de cadelas, relacionando-os ao tipo tumoral e a outros fatores prognósticos clássicos, como estadiamento clínico, tempo de evolução, presença de ulceração e de vascularização.

REVISÃO DE LITERATURA

2.3 Neoplasias mamárias caninas

As glândulas mamárias são glândulas sudoríparas modificadas responsáveis pela secreção de leite para alimentação das crias. São classificadas como glândulas apócrinas túbulo-alveolares compostas, com um parênquima formado por uma camada única de células epiteliais secretoras, que se agrupam formando alvéolos mamários, envolvidos por células contráteis de natureza mioepitelial, unindo-se em lóbulos, e posteriormente, em lobos mamários (CARVALHO, 2006).

A cadela apresenta, em média, cinco pares de glândulas mamárias, denominadas torácicas craniais, torácicas caudais, abdominais craniais, abdominais caudais e inguiniais (KOLB, 1987). O estrógeno é responsável por promover o crescimento de ductos a cada estro, enquanto a progesterona promove o crescimento e desenvolvimento dos alvéolos (PETELEIRO, 1994). A prolactina por sua vez, cujas concentrações aumentam nas semanas finais da gestação, prepara o tecido mamário para lactação (FELDMAN & NELSON, 2015). Dessa forma, as glândulas mamárias se diferenciam e envolvem repetidamente. Tais modificações do tecido glandular, apesar de serem fisiológicas, podem levar ao desenvolvimento de alterações neoplásicas diversas, principalmente na região epitelial (ZUCCARI et al., 2001).

Os tumores mamários são comuns em cães, tendo sido relatada uma frequência superior a 50% nas fêmeas caninas (QUEIROGA & LOPES, 2002; OLIVEIRA et al., 2003, OLIVEIRA FILHO et al., 2010, FELICIANO et al., 2012). De acordo com De Nardi et al. (2002), os tumores de mama representam aproximadamente 45,6% de todas as neoplasias na fêmea canina, sendo que 68,4% destas são malignas. Dada à frequência com que surgem na rotina veterinária e importância que os cães possuem como animais de companhia, o estudo das neoplasias mamárias caninas ganha destaque na clínica veterinária (FONSECA & DALECK, 2000).

Neoplasias são definidas como um crescimento de células novas, originalmente derivadas de tecidos normais que sofreram alterações genéticas, permitindo-lhes que não respondam aos controles de crescimento e se expandem para além dos limites normais (McGAVIN & ZACHARY, 2009).

A etiologia das neoplasias mamárias é controversa, sendo consideradas várias hipóteses diferentes. O tumor de mama é resultante de um processo carcinogênico

compreendido por vários estágios que incluem iniciação, promoção, dependência e autonomia. Independentemente do fator iniciante da carcinogênese, fatores endócrinos podem ser responsáveis pela promoção do tumor. A fase seguinte desse processo é a dependência hormonal, na qual as células tumorais diferem das normais por necessitarem do estímulo hormonal para sua sobrevivência. Se o aporte hormonal for removido, todas as células desaparecerão nessa fase. Finalmente, todos os tumores hormonalmente dependentes tendem a se tornar autônomos, quando a capacidade de síntese de hormônios específicos desaparece e, morfológicamente, as células se tornam indiferenciadas (FONSECA & DALECK, 2000). Os hormônios são um dos fatores responsáveis pelo surgimento das neoplasias. Sejam endógenos ou exógenos, eles são responsáveis por estimular a proliferação celular, o que, por sua vez, predispõe às alterações genéticas (HENDERSON & FEIGELSON, 2000).

Outros fatores estão envolvidos na oncogênese mamária, que incluem idade, alimentação, castração e alimentação, entre outros. A idade é um fator influente no surgimento das neoplasias mamárias caninas, devido ao maior tempo de exposição dos animais aos fatores considerados como de risco. De acordo com Moulton et al. (1990) os tumores de mama são raros em cadelas com idade inferior a 2 anos, porém a incidência aumenta notadamente a partir dos 6 anos de idade, continuando a aumentar até os 10 anos, quando a ocorrência começa a diminuir, sendo raros também em cadelas com idade superior a 10 anos. Oliveira Filho et al. (2010) relataram que a idade dos animais acometidos variou de um ano e quatro meses a 19 anos, com média de idade de 9,2 anos, resultado semelhante ao obtido por Oliveira et al. (2003) que verificou média de idade de 9 e 10 anos, para tumores benignos e malignos, respectivamente.

Dentre os demais fatores envolvidos na oncogênese mamária, a hipótese do envolvimento de um componente etiológico hormonal tem sido bastante aceita, tendo em vista que são verificadas diferenças significativas quanto ao risco em cadelas castradas e não castradas, dependendo ainda da fase em que a intervenção cirúrgica é efetuada (FONSECA & DALECK, 2000). Nas cadelas, a ovariossalpingohisterectomia realizada antes do primeiro cio reduz o risco de desenvolvimento de tumores mamários para 0,5%; este risco aumenta significativamente nas fêmeas esterilizadas após o primeiro ciclo estral (8,0%) e o segundo (26%). A proteção conferida pela castração desaparece após os dois anos e meio de idade, quando nenhum efeito é obtido (QUEIROGA & LOPES, 2002).

Somado à influência hormonal, é possível considerar ainda a influência da dieta, visto que o estado nutricional é um fator que influencia na qualidade de vida do animal doente, interferindo na resposta ao tratamento da neoplasia e reduzindo seu tempo de sobrevida

(CAMPOS et al., 2012). Estudos concluíram que o risco de aparecimento do tumor mamário pode estar ligado a fatores nutricionais já interagindo nos primeiros meses de vida do animal, principalmente antes do primeiro cio (ZUCCARI et al., 2001).

Em animais magros, verificou-se uma menor incidência de câncer que em animais obesos. Sonnenschein et al. (1991) em seu estudo verificou que fatores nutricionais atuantes em animais jovens podem ter importância etiológica no surgimento dos tumores de mama, afirmando que a alimentação caseira, quando associada à alta ingestão de carnes bovina, suína e de gordura animal, podem estar relacionadas com a obesidade, que, por sua vez, relaciona-se ao desenvolvimento das neoplasias mamárias, assumindo papel promotor, e não iniciador da carcinogênese. De acordo com Toríbio et al. (2012) há uma relação direta entre acréscimo de comida caseira na dieta e obesidade. Philbert et al. (2003) consideram que a obesidade pode predispor a uma maior concentração de estrógeno circulante, entre outros hormônios, o que favoreceria a proliferação de células epiteliais com receptores para estes hormônios.

Os tumores das glândulas mamárias podem ocorrer em qualquer um dos cinco pares, porém desenvolvimento das neoplasias mamárias é menos frequente nas glândulas torácicas. Cerca de 60% dos tumores estão localizados nas glândulas abdominais e inguinais, provavelmente devido à maior quantidade de parênquima e conseqüente maior atividade proliferativa em resposta ao estrógeno (MOULTON et al., 1990, OLIVEIRA et al., 2003, OLIVEIRA FILHO, 2010). É comum que mais de uma glândula esteja acometida, ou que uma mesma mama possua mais de uma massa tumoral, o que permite considerar as neoplasias mamárias caninas como multicêntricas (FONSECA & DALECK, 2000).

Os tumores mamários se apresentam como nódulos circunscritos e de dimensões variáveis, podendo ser móveis ou aderidos aos tecidos de sustentação, com presença ou não de envolvimento cutâneo e muscular. Ao corte, podem apresentar aspecto sólido, cístico ou misto (RUTTEMAN et al., 2001). As características de ulceração e aderência a tecidos vizinhos normalmente estão relacionadas às neoplasias malignas, contudo, apenas o exame histopatológico é capaz de fornecer o diagnóstico (SCHMITT, 2000).

Para o estabelecimento do correto diagnóstico e prognóstico são importantes o histórico clínico detalhado, o exame clínico completo e o diagnóstico microscópico da lesão. No momento do exame clínico, é necessário realizar um levantamento abrangente de toda a história progressiva do paciente. Informações sobre o ambiente, alimentação, a história médica, os registros de tratamentos anteriores, além de duração, velocidade de crescimento, e presença ou não de edema, aderências e ulcerações também são de extrema importância para o diagnóstico e tratamento das neoplasias. Determinadas características, como forma irregular,

maior diâmetro e presença de ulceração e aderência e acometimento de linfonodos indicam maior probabilidade de se tratarem de neoplasias malignas, porém apenas com o exame físico não é possível realizar este tipo de determinação, fazendo-se sempre necessário o exame histopatológico (RAMOS et al., 2012). A demora na apresentação dos pacientes no hospital pode ser responsável pela maior malignidade, pois tumores benignos podem vir a se tornar malignos (SORENMO et al., 2009).

Os tumores mamários são classificados através do sistema TNM (tumor-linfonodo-metástase), proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS). De acordo com esta classificação, a categoria T descreve o tumor primário, especificamente o tamanho do tumor: T0 (sem evidência de tumor), T1 (menor que 3 cm de diâmetro), T2 (entre 3 e 5 cm), T3 (maior que 5 cm); e T4 (carcinoma inflamatório). A categoria N descreve o envolvimento dos linfonodos regionais, em que N0 representa características histológicas do linfonodo normais, N1 apresenta nódulo linfático positivo ipsilateral, e N2 apresenta nódulos linfáticos positivos bilaterais. A categoria M representa metástases à distância; M0 indica que não há metástases e M1 indica a presença de metástases à distância. A determinação do estadiamento clínico permite a definição da extensão do tumor, e, como consequência torna possível estabelecer um prognóstico e planejar um tratamento (CASSALI et al., 2011). A classificação em estádios clínicos permite informar o prognóstico das neoplasias mamárias, a partir da alocação de graus, que variam de I a V e o prognóstico piora com o aumento na ordem crescente da classificação (RUTTEMAN et al., 2001).

Quadro 1. Estadiamento das neoplasias mamárias caninas

Estágio	Classificação TNM
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T3 N0 M0
IV	Qualquer T N1 M0
V	Qualquer T Qualquer N M1

Fonte: Midsorp (2002)

A extensão do tumor no momento da cirurgia tem uma relação direta com o risco de recorrência ou com aparecimento de tumores secundários. O tamanho do tumor é considerado um fator prognóstico independente para fêmeas portadoras de neoplasias mamárias. Tumores com três cm ou menos estão relacionados com um melhor prognóstico quando comparados com tumores maiores (CASSALI et al., 2011).

A investigação dos linfonodos adjacentes também constitui uma importante etapa do exame clínico para verificação do envolvimento destes no processo neoplásico, e deve ser incluída na rotina clínica de avaliação de cadelas portadoras de neoplasias mamárias. A citologia é um método seguro para inspeção dos linfonodos, com uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 96% para identificação de metástases (CASSALI et al., 2011). Quando ocorrem metástases em linfonodos regionais, há uma significativa queda na expectativa de sobrevida em relação aos indivíduos com pesquisa negativa para metástase em linfonodos (SONRENMO, 2003). Em mulheres, a presença ou ausência de metástases em linfonodos é o mais importante fator prognóstico em tumores de mama (SOARES et al., 2007).

As neoplasias mamárias caninas podem se originar de células de revestimento epitelial, ductal ou alveolar, de células mioepiteliais periféricas e do tecido conjuntivo intersticial (CARRUIDO et al., 2003). As que se originam de células epiteliais são denominadas de carcinomas e aquelas com origem no tecido conjuntivo ou muscular são denominadas sarcomas (ALBERTS et al., 1997).

As neoplasias mamárias apresentam grande diversidade morfológica, por surgirem de uma população variada, que, frequentemente, se encontra associada no mesmo tipo de tumor, o que dificulta a classificação (PELETEIRO, 1994; MIDSORP, 2002). Os tumores mamários malignos apresentam algum grau de infiltração em tecidos adjacentes e/ou invasão de vasos. A descontinuidade da membrana basal também pode ser considerada um indicativo de malignidade. Os tumores benignos, por sua vez, não costumam apresentar crescimento invasivo e geralmente são encapsulados. A presença de necrose e de figuras mitóticas, de anaplasia, pleomorfismo celular e nuclear é mais frequente nos processos malignos (MIDSORP, 2002).

Os métodos para classificação das neoplasias mamárias caninas variam consideravelmente. O valor das classificações histológicas é baseado na capacidade de predição do comportamento biológico da neoplasia. Como existem muitas classificações morfológicas propostas, as diferenças geram divergências em levantamentos epidemiológicos e em relatos de casos (HAMPE & MIDSORP 1974; MONLUX et al., 1977; MOULTON, 1990; MIDSORP, 2002).

A uniformização da nomenclatura é desejável para que dados epidemiológicos obtidos em regiões diferentes possam ser comparados e medidas terapêuticas ou preventivas possam, também, ser comparadas em diferentes centros de pesquisa. Nesse sentido, no presente trabalho foi utilizada a classificação de Cassali et al. (2011).

Quadro 2. Classificação das neoplasias mamárias caninas, segundo Cassali et al. (2011).

Tumores Malignos	Tumores Benignos
<ol style="list-style-type: none"> 1. Carcinoma in situ <ol style="list-style-type: none"> 1.1 Carcinoma Ductal in situ 1.2 Carcinoma Lobular in situ 2. Carcinoma em tumor misto 3. Carcinoma complexo 4. Carcinoma papilar 5. Carcinoma tubular 6. Carcinoma sólido 7. Tipos especiais de carcinoma <ol style="list-style-type: none"> 7.1 Carcinoma micropapilar 7.2 Carcinoma lobular invasivo 7.3 Carcinoma lobular pleomórfico 7.4 Carcinoma secretório 7.5 Carcinoma mucinoso 7.6 Carcinoma rico em lipídeos 7.7 Carcinoma de células escamosas 7.8 Carcinoma de células fusiformes 7.9 Carcinoma anaplásico 7.10 Neoplasma mamário com diferenciação sebácea 8. Sarcomas <ol style="list-style-type: none"> 8.1 Fibrossarcoma 8.2 Osteossarcoma 8.3 Carcinossarcoma 8.4 Sarcoma em tumor misto 9. Outros tipos de sarcoma <ol style="list-style-type: none"> 9.1 Condrossarcoma 9.2 Lipossarcoma 9.3 Hemangiossarcoma 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Adenoma 2. Adenoma complexo 3. Adenoma basalóide 4. Fibroadenoma 3. Tumor misto benigno 4. Papiloma ductal

Oliveira et al. (2003) identificaram os carcinomas como o tipo tumoral mais frequente, sendo que mais de um tipo histológico de tumor foi identificado em 25,9% das cadelas. Os tumores benignos são classificados geralmente como fibroadenomas ou adenomas, enquanto os malignos, em sua maior parte, classificam-se como carcinomas, sarcomas e carcinosarcomas (RAMOS et al., 2012). Em estudo realizado por Rêgo (2012) verificou-se que o tipo mais comum de neoplasia observado foi o carcinoma complexo, enquanto Moulton (1990) cita os tumores mistos benignos como os mais frequentes em cadelas. Ferguson (1985) em seu trabalho destaca como os mais comuns os adenocarcinomas, seguidos pelos tumores mistos, já para Daleck et al. (1998) os mais comuns foram os carcinomas seguidos pelos tumores mistos. A maioria dos tumores malignos é de origem epitelial e metastiza para os pulmões ou outros órgãos.

O método de eleição para o diagnóstico das neoplasias é o exame histopatológico, que permite a obtenção de informações consistentes sobre os fatores prognósticos do câncer mamário, e deve ser considerado como um passo fundamental para a orientação terapêutica destas lesões (SCHMITT, 2000). A realização da citologia aspirativa antes do encaminhamento da paciente à cirurgia contribui na escolha do procedimento correto a ser executado pelo cirurgião, permitindo uma atuação mais segura. Tanto a citologia como a histopatologia apresentam resultados semelhantes, mas somente a histopatologia deve ser usada para confirmação do diagnóstico (DALECK et al., 1998). Diversas variáveis, como tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos, invasão vascular e grau de diferenciação da neoplasia têm sido usadas como parâmetros na avaliação do prognóstico. No intuito de trazer mais informações a respeito da histogênese das neoplasias mamárias, suas características histológicas e possíveis prognósticos, outras técnicas para caracterização dos tumores vêm sendo bastante pesquisadas nos últimos anos, e incluem a identificação de marcadores imunohistoquímicos, a expressão gênica de marcadores, e a dosagem séricas de marcadores tumorais. Investigações recentes têm como proposta a utilização desses marcadores no auxílio a detecção precoce de recidivas, acompanhamento do animal durante o tratamento quimioterápico contribuindo para uma melhor avaliação da evolução da doença (CAMPOS et al., 2012).

Na maioria dos casos, a exérese cirúrgica é o tratamento de escolha, sendo indicada a remoção total da cadeia mamária, independentemente do número e localização das massas tumorais (STRATMANN, 2008). Ramos et al. (2012) afirmam que a remoção cirúrgica completa de neoplasias localizadas, sem envolvimento metastático, ainda é o procedimento terapêutico que confere maior probabilidade de cura dos tumores mamários. De acordo com

Allen e Mahaffey (1989) os procedimentos cirúrgicos são classificados em lumpectomia, mastectomia simples, mastectomia regional, mastectomia unilateral e mastectomia bilateral. O procedimento cirúrgico é escolhido com base na drenagem linfática das glândulas mamárias, ou seja: se as glândulas torácicas apresentarem tumor, essas e a glândula abdominal cranial devem ser removidas; se as glândulas cometidas forem as abdominal caudal e inguinal, ambas são removidas; por sua vez, se o tumor estiver localizado nas glândulas abdominais craniais, toda cadeia deve ser retirada. Novosad (2003) relata que, em cães, o melhor plano cirúrgico envolve a retirada de todo tecido afetado com margem de segurança. Em tumores malignos, alguns autores recomendam a mastectomia radical com excisão dos linfonodos axilares e inguinais se estes estiverem acometidos. Daleck et al. (1998) sugeriram que a lumpectomia, mastectomia regional e mastectomia em bloco, associadas à quimioterapia trouxeram resultados positivos no que diz respeito à taxa de sobrevida de cadelas portadoras de neoplasias mamárias submetidas à cirurgia.

A remoção da glândula responsável pela secreção do hormônio indutor ou promotor da carcinogênese é um dos procedimentos propostos para pacientes portadoras de neoplasias. Muitas vezes a remoção dos ovários e adrenais conduz à regressão de alguns tumores. Exemplo disso tem sido observado nas neoplasias de mama em que há regressão dos tumores primários e das metastáses no pulmão e linfonodos após a exérese ovariana (NORMAN & LITWACK, 1997). Entretanto, uma resposta satisfatória somente é obtida quando grande parte da neoplasia ainda é responsiva ao hormônio (HENDERSON et al., 1991). De acordo com Zuccari et al. (2001) a realização da castração no momento da mastectomia não tem influência sobre o prognóstico ou sobrevida da paciente.

Para um câncer invasivo ou com elevado potencial metastático, os procedimentos cirúrgicos podem ser combinados a outras modalidades terapêuticas, como a radioterapia, a quimioterapia e a imunoterapia. A quimioterapia é um método de tratamento adjuvante á cirurgia. Outros métodos ainda são pouco utilizados na medicina veterinária (NOVOSAD, 2003). Segundo De Nardi et al. (2002), a cirurgia combinada com a poliquimioterapia coadjuvante podem ser de grande importância no controle de micrometástases em potencial, pois das 11 fêmeas tratadas com doxorubicina e ciclofosfamida oito tiveram 18 meses de sobrevida. Daleck et al. (1998) encontraram resultados positivos para associação de quimioterápicos (desoxorubicina e ciclofosfamida) no tratamento pós-cirúrgico de cadelas portadoras de neoplasias mamárias.

O prognóstico para pacientes portadoras de neoplasias mamárias irá variar de acordo com o tamanho da neoplasia, tipo histológico, acometimento de linfonodos, presença de

metástases, entre outros. Alguns estudos vêm apontando novos marcadores tumorais no âmbito da biologia molecular, que buscam a prevenção, diagnóstico precoce e tratamento mais eficazes (CASSALI et al., 2007).

Marcadores tumorais ou biomarcadores são substâncias que estão presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos ou primariamente pelo próprio tumor, ou secundariamente pelo paciente em resposta a este primeiro. A concentração dessas substâncias deve refletir a extensão do tumor, a resposta ao tratamento e a progressão da doença (JACOBS & HASKELL, 1991). Analisado em conjunto com a anamnese e resultados dos demais exames, o biomarcador pode trazer informações importantes para escolha da terapia e acompanhamento da evolução clínica do paciente. Estudos têm demonstrado que as células neoplásicas do tumor de mama migram precocemente para a circulação e que o tempo envolvido na detecção dessas células está diretamente relacionado ao prognóstico da doença (BICALHO, 2012).

Em humanos, marcadores séricos tumorais desenvolvem um importante papel no manejo do paciente. Numerosos marcadores tumorais séricos têm sido descritos para uso em câncer de mama. Em medicina veterinária, estes marcadores ainda são pouco estudados (CAMPOS et al., 2012).

2.4 Influência hormonal na oncogênese

A transformação neoplásica é multifatorial e assim sendo diversos fatores parecem estar ligados à etiologia das neoplasias mamárias caninas. Dentre estes os esteróides ovarianos são considerados como um dos fatores etiológicos dos tumores mamários em cadelas, pois quase todos os animais afetados são fêmeas, e a ovariectomia precoce diminui a incidência (FERRI, 2003). Em se tratando da carcinogênese hormonal, a proliferação celular antecede ou sucede as mutações genéticas (SILVA et al., 2004a).

Na carcinogênese hormonal a proliferação celular não necessita de um agente iniciador específico. Os hormônios induzem a proliferação celular com consequentes mutações genéticas que darão origem à transformação neoplásica (MIDSORP, 2002). Os hormônios esteróides sexuais (estrógeno e progesterona), prolactina (PRL), hormônio de crescimento (GH), fatores de crescimento (fator de crescimento tumoral - TGF e fator de crescimento epidermal - EGF) bem como os hormônios tireoidianos estão envolvidos na carcinogênese mamária (NOGUEIRA & BRENTANI, 1996; SILVA et al., 2004b; VERSTEGEN &

ONCLIN, 2006). Receptores de estrogênio e progesterona estão presentes tanto no tecido neoplásico quanto no tecido mamário normal (RAMOS et al., 2012).

Existe um conjunto de dados significativo que aponta para a possibilidade dos hormônios e, em particular, os esteróides, desempenharem papel importante na etiologia dos tumores mamários. Alguns autores associam o aparecimento dos tumores à desordens reprodutivas como cistos foliculares e ocorrência de pseudociese, bem como à utilização de anticoncepcionais (FONSECA & DALECK, 2000).

A pseudogestação também pode ter relação com neoplasias mamárias, embora alguns autores afirmem que essa condição não predispõe ao desenvolvimento tumoral. A pseudogestação ocorre na fase de diestro, quando há um aumento na concentração de progesterona que tem como função a supressão da atividade do miométrio, crescimento das glândulas endometriais e promoção do desenvolvimento das glândulas mamárias (RAMOS et al., 2012). Em animais com pseudogestação, os níveis de prolactina são altos, o que predispõe à formação de tumores, associado ao fato de que o leite retido cronicamente pode conter compostos químicos que possuam efeito carcinogênico sobre o epitélio mamário (ZUCCARI et al., 2001). Apesar dos estudos, Midsorp (2002) afirma que os resultados que relacionam a ocorrência de pseudogestação ainda são conflitantes.

Os hormônios esteróides sexuais femininos, sobretudo o estrogênio, desempenham papel fundamental no desenvolvimento das neoplasias mamárias caninas (FONSECA & DALECK, 2000). Os hormônios esteróides agem sobre as células epiteliais da mama com diferentes intensidades, de acordo com a fase do ciclo estral e podem induzir proliferação celular com consequentes mutações genéticas que darão origem à célula neoplásica (MIDSORP, 2002).

A evidência da etiologia hormonal para as neoplasias mamárias caninas vem sendo verificada em diversos trabalhos, sendo que o índice de risco varia entre cadelas castradas e não castradas e ainda de acordo com a fase na qual a intervenção cirúrgica é efetuada. A ovariectomia (OH) realizada no momento da exérese cirúrgica do tumor de mama, em cadelas, não tem efeito protetor sobre o aparecimento de novos tumores, metástases ou mesmo, sobre o prolongamento de vida do paciente. Quando a OH é realizada antes do primeiro estro, verifica-se uma redução do risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias para 0,5%; quando o procedimento é realizado após o primeiro ciclo estral, o risco passa para 8%, e, após o segundo, para 26% (FONSECA & DALECK, 2000).

Ramos et al. (2012) verificaram em seu trabalho que 96% das cadelas que apresentavam tumores mamários não eram castradas, contudo, não verificou influência da

ausência de castração no grau de malignidade das lesões. Ainda segundo este mesmo trabalho, as cadelas que fizeram uso de métodos contraceptivos possuem mais chances de apresentarem neoplasias malignas, bem como aquelas que apresentaram histórico de pseudogestação.

Para que o tumor de mama se desenvolva é necessária administração prolongada (MIALOT, 1998) ou doses muito elevadas de progestágenos (MIALOT, 1998; MORRISSON, 1998). O longo período de tempo necessário para o desenvolvimento de tumor de mama, em animais submetidos à terapia hormonal, indica que os hormônios agem como promotores e não iniciadores no desenvolvimento da neoplasia mamária (FONSECA & DALECK, 2000). De acordo com Perez et al. (2000), a administração de acetato de medroxiprogesterona em cães resulta em um aumento na produção de hormônio do crescimento, supressão do córtex adrenal e desenvolvimento de displasias e tumores mamários benignos.

Quando as neoplasias são influenciadas por hormônios esteróides, geralmente se tornam dependentes de altos níveis desses hormônios para sua multiplicação, essa é a fase de dependência do tumor. Todos os tumores cuja indução tenha ocorrido através de um suporte hormonal, tendem a se tornar autônomos. Essa autonomia, a fase final desse tipo de carcinogênese, é característica comum aos tumores hormônios-dependentes (RAMOS et al., 2012).

O possível papel da glândula pituitária no tumor de mama canino também tem recebido atenção, sendo que alguns relatos conflitantes foram publicados sobre a elevação dos níveis de prolactina em cães portadores dessa neoplasia (FONSECA & DALECK, 2000). O risco de desenvolvimento do câncer de mama é essencialmente determinado pela intensidade e duração da exposição do epitélio mamário à ação conjunta da prolactina e do estrógeno (KOJIMA et al., 1996). Aparentemente a prolactina facilita a ação mitótica do estrógeno, aumentando o número de seus receptores. Mas a possibilidade da prolactina estimular a atividade mitótica das células do epitélio mamário não pode ser afastada (MULDOON, 1981).

Tem sido observada uma associação entre os níveis de hormônios esteróides e o tamanho e taxa de crescimento tumoral. Do mesmo modo, os níveis de hormônios esteróides também são associados com características clínicas dos tumores como ulceração de pele, aderência à pele ou aos tecidos de sustentação (RAMOS et al., 2012).

A dependência hormonal dos tumores mamários caninos geralmente diminui com o aumento da malignidade e alta proliferação celular, o que piora o prognóstico devido à perda de diferenciação da neoplasia, bem como reduz as possibilidades de utilização da hormonioterapia como tratamento. A função dos receptores hormonais nas neoplasias

mamárias caninas tem sido exaustivamente estudada. Acredita-se que exista relação entre o número desses receptores e a capacidade proliferativa das células neoplásicas (COSTA et al., 2002).

O diferente padrão de expressão dos hormônios esteróides nas neoplasias mamárias pode ser relevante para selecionar os pacientes que podem se beneficiar da terapia endócrina e estudar protocolos terapêuticos baseados na administração de antagonistas de receptores de hormônios esteróides (MILANTA et al., 2005). Assim, o estudo de receptores de estrógeno e progesterona tornaram-se ferramentas para estabelecer o prognóstico e para avaliar de que forma o tratamento hormonal pode ser mais benéfico que a terapia citotóxica.

2.5 Marcadores tumorais em neoplasias mamárias caninas

2.5.1 Marcador Ca 15.3

Moléculas que são associadas com a presença do câncer têm sido extensivamente estudadas e utilizadas na prática clínica humana nos últimos 30 anos. O antígeno do câncer 15.3 (CA15.3) é uma glicoproteína com alto peso molecular produto do gene MUC 1, e está relacionada à adesão celular (DUFFY et al., 1999). MUC1 é responsável por diversas propriedades celulares, que incluem proliferação celular, adesão, apoptose e invasão. A função exata da mucina nas células normais ainda está em discussão. Ela tem sido usada como marcador de muitos carcinomas humanos, apresentando, por isso, grande importância no diagnóstico. Nas células malignas, a presença da mucina está elevada e a orientação dentro dos tecidos não está longamente polarizada até a superfície. O antígeno do câncer 15.3, por sua vez, é produzido em pequenas quantidades pelas células normais da mama e superexpressa por uma variedade de adenocarcinomas, especialmente os relacionados ao câncer de mama (SOUZA, 2002).

A sensibilidade deste marcador varia de acordo com a massa tumoral e o estadiamento clínico da doença, apresentando níveis séricos elevados em 60 a 80% das pacientes com metástases em câncer de mama (CHEUNG et al., 2000). A dosagem do CA 15-3 no pré-operatório para câncer de mama em mulheres, em estágio inicial, parece ter uma relação positiva, pois pode orientar para uma terapia coadjuvante mais agressiva ou apropriada a cada caso (SOUZA, 2002). Em humanos, altos níveis séricos de CA 15.3 estão correlacionados com o tamanho do tumor, estágio da doença e presença de metástase em linfonodos (MANUALI et al., 2012).

Apesar do marcador tumoral CA 15.3 ser amplamente estudado em medicina humana desde a década de 80 e continue sendo o marcador de eleição para diagnóstico precoce de metástases de tumor mamário em mulheres, poucas referências existem no que se refere à medicina veterinária (BICALHO, 2012).

Vários estudos têm mostrado que o CA 15-3 aumenta com o avanço do estágio da doença. No entanto, níveis baixos não excluem metástases e também valores altos no pré-operatório nem sempre correspondem a mau prognóstico (SOUZA, 2002). Bicalho (2012) realizou a dosagem de CA15.3 em 100 cadelas híidas através do métodos de quimioluminescência, contudo, só encontrou valores detectáveis pelo kit utilizado após a concentração do soro. Em trabalho realizado por Campos et al. (2012) em cadelas com e sem metástase em câncer de mama, os resultados encontrados sugerem que a elevação na concentração sanguínea do marcador CA 15.3 é proporcional ao estadiamento clínico da doença. Manuali et al. (2012) detectaram a presença de CA15.3 em cadelas portadoras de neoplasias malignas, em concentrações maiores do que naquelas que não apresentavam neoplasias. Marchesi et al. (2010) verificou maiores concentrações séricas de CA15.3 em cadelas portadoras de neoplasias mamárias, quando em comparação com cadelas híidas.

A concentração da maioria dos marcadores tumorais é extremamente baixa no sangue, por isso o método que avalia os marcadores deve ser muito sensível (SOUZA, 2002). A vantagem da detecção através eletroquimioluminescência em comparação com os demais métodos, consiste na preparação simples, na alta estabilidade dos reagentes em uma grande sensibilidade do teste. Os primeiros ensaios utilizados na detecção do CA 15.3 eram manuais. Mais tarde tornaram-se disponíveis ensaios imunoenzimáticos e recentemente os imunoenaios automatizados vieram acrescentar velocidade e precisão aos resultados (HUBER et. al., 1996).

2.5.2 Estrógeno

Os estrógenos são considerados os promotores da iniciação das células mamárias cancerígenas e podem aumentar a taxa de proliferação pelo recrutamento de células não cíclicas dentro do ciclo celular (RAMOS et al., 2012). O estrógeno estimula a atividade mitótica do epitélio mamário, o que eleva o risco de aparecimento do tumor, entretanto não determina seu surgimento. Uma série de outros fatores está relacionada à carcinogênese que, associados à influência hormonal, em fases distintas da formação do tumor pode ter papel

determinante seja na multiplicação, seja na transformação genômica das células (PETELEIRO, 1994).

Os receptores de estrógeno estão presentes tanto no tecido mamário normal quanto no tecido neoplásico. A presença de RE no citoplasma de células tumorais é sinal claro da dependência hormonal dessas neoplasias, e a presença simultânea de RE e RP, considerado como marcador da ação estrogênica, reforça ainda mais essa dependência (RAMOS et al., 2012). A identificação do receptor estrógeno tornou-se foco principal em vários estudos epidemiológicos de fatores de risco associados ao câncer de mama humano e canino (CIOCCA et al., 1997; SUTHERLAND et al., 1998).

Ramos et al. (2012) verificaram em seu trabalho que cadelas portadoras de neoplasias benignas e malignas expressaram receptor de estrógeno (RE α e RE β), sendo que a expressão RE β foi inferior a de RE α , sendo a expressão de ambos maior nas neoplasias malignas de origem mista, mas ainda assim, são menos expressos que nas neoplasias benignas. Sartin et al. (1992) não obtiveram sucesso na dosagem de estrógeno plasmático em cadelas não castradas, portadoras de tumor de mama, no momento da cirurgia, porque o nível hormonal era inferior ao limite mínimo passível de ser detectado no ensaio.

Os efeitos de regulação e proliferação causados pelo estrógeno são mediados por dois receptores nucleares distintos, o ER α e o ER β (KUIPER et al., 1996; MOSSSELMAN et al., 1996; WALKER, 1999). Estes receptores, mapeados em 6q25.1 e 14q22-q24, respectivamente, podem formar heterodímeros (OGAWA et al., 1998), sugerindo um possível papel do ER β como modulador do ER α (GRUVBERGER-SAAL et al., 2007). Em adição, a associação com co-ativadores permite a ligação aos elementos de resposta ao estrógeno (EREs), localizados em regiões promotoras de genes alvos. Este complexo molecular liga-se ao DNA ativando a transcrição de genes responsivos ao estrógeno, que por sua vez podem ser responsáveis pelo crescimento tumoral.

A expressão do receptor de estrógeno (RE) é sem dúvida o mais importante biomarcador em câncer de mama em humanos, pois ele fornece o índice de sensibilidade ao tratamento endócrino (BUITRAGO et al., 2011). Em cadelas, é elevada a proporção de tumores benignos da mama que apresentam um aumento de receptores de estrógeno e progesterona. Ao contrário, apenas uma parte das neoplasias malignas apresenta esses receptores e em concentrações menores, pois com a progressão do tumor e aumento da malignidade ocorre redução da dependência hormonal (JONHSTON, 1993). Em pacientes humanos, a seleção de mulheres com RE positivo no tumor primário eleva o nível de resposta

clínica para 60%, ao passo que somente 10% das pacientes com RE negativo respondem à hormonioterapia. Entretanto ainda permanecem 40% de pacientes RE positivas que não se beneficiam com o tratamento endócrino (DEPES et al., 2003).

A presença de receptores hormonais está associada a um maior potencial mitogênico e indução à proliferação celular por ativação de ciclinas no epitélio mamário (YANG et al., 1996). Entretanto, a ausência de expressão de receptores de estrógeno pode ser observada em processos proliferativos na mama, sugerindo que outros mecanismos de controle de proliferação celular podem estar envolvidos no surgimento de hiperplasias mamárias. A ativação de receptores hormonais, além de promover a regulação da expressão de ciclinas, está relacionada ao aumento da proliferação e estímulo a migração celular, em lesões epiteliais mamárias, por regulação da expressão de moléculas de adesão, tais como E-caderina e P-caderina (HELGUERO et al., 2008).

2.5.3 Progesterona

A progesterona é um hormônio esteroide que tem como funções a supressão da atividade do miométrio, a estimulação do crescimento das glândulas endometriais e a promoção do desenvolvimento do tecido alveolar mamário. Isoladamente, a progesterona não é considerada como carcinogênica, contudo, pode apresentar um papel muito importante no desenvolvimento dos tumores mamários uma vez que cria um ambiente altamente proliferativo o que estimula o crescimento dos tumores ocasionados por outros fatores (MARTINS & LOPES, 2005).

A influência da progesterona é que provavelmente ela seja proliferativa no processo de desenvolvimento mamário, através do ciclo genético celular, fatores de crescimento e receptores dos fatores de crescimento (GRAHAM & CLARKE, 1997). Em cadelas, o uso de progesterona exógena é responsável pela síntese de hormônio do crescimento na glândula mamária, com conseqüente proliferação lóbulo-alveolar e hiperplasia de elementos mioepiteliais e secretórios, o que induz a formação de nódulos benignos em animais jovens (MIDSORP, 2002). Tais alterações podem predispor o tecido a uma transformação maligna (ZUCCARI et al., 2001).

Ramos et al. (2012) concluíram em seu trabalho, que os tumores mamários são capazes de sintetizar progesterona, funcionando assim como um órgão endócrino. Além disso, verificaram também que as neoplasias, de um modo geral, sintetizam uma quantidade maior de progesterona em comparação à glândula mamária normal. Além disso, esse mesmo autor

verificou que cadelas portadoras de neoplasias benignas e malignas expressaram receptor de progesterona, sendo este menos expresso nas neoplasias malignas.

A progesterona provavelmente está envolvida com o aumento da produção de hormônio do crescimento (GH) autócrino, que, por sua vez, pode ser capaz de estimular a síntese local ou sistêmica da secreção de fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I). Adicionalmente, o efeito do IGF-I pode ser influenciado por níveis locais de estradiol (17-E2). Esses resultados sugerem que todos esses hormônios e fatores podem atuar como fatores de crescimento local estimulando o desenvolvimento e/ou manutenção dos tumores mamários caninos em um modo autócrino/parácrino (QUEIROGA et al., 2008).

2.5.4 Prolactina

A prolactina é um neuropeptídeo produzido pelas células lactotróficas da adenohipófise, sendo sua secreção estimulada por meio da supressão de dopamina hipotalâmica. Ela é responsável pela manutenção da atividade secretória, não desempenhando papel sobre a proliferação celular da glândula mamária. Entretanto, estimula o crescimento do tumor mamário devido à sensibilização celular aos efeitos do estrógeno, promovendo um aumento no número de receptores deste último (FONSECA & DALECK, 2000). Contudo, a possibilidade da prolactina estimular a atividade mitótica das células do epitélio mamário não pode ser afastada (MULDOON, 1981). Com base em estudos morfológicos da glândula pituitária e em níveis hormonais no soro, foi sugerido que o hormônio do crescimento ou qualquer desequilíbrio de prolactina pode ser associada com a carcinogênese mamaria no cão (MIDSORP, 2002).

Baseado em estudos morfológicos da glândula pituitária e os níveis séricos hormonais, sugeriu-se que tanto o hormônio do crescimento como a prolactina estão relacionados e associados com a carcinogênese mamária em cães. Contrariamente, outros estudos não observaram tal associação (MIDSOPR, 2002). De acordo com Rutteman (1990) anormalidades pituitárias são capazes de promover o desenvolvimento de neoplasias.

Smyth (1997) afirma em seu trabalho que no hipotireoidismo, o aumento da secreção de prolactina tem sido incriminado como um dos fatores que agravam o prognóstico da neoplasia mamária. Em humanos, a hipótese de que as disfunções tireoidianas participam da origem do câncer de mama não é recente, porém, é bastante controversa (SILVA et al., 2004b). Alguns relatos sugerem que o hipotireoidismo aumenta o risco do câncer de mama (WEISS et al., 1999), entretanto também há relatos que indicam que a indução do

hipotireoidismo retarda o crescimento neoplásico e melhora o prognóstico do tratamento quimioterápico em camundongos (THEODOSSIOU & SCHWARZENBERGER, 2000). Silva et al. (2004b) verificaram que o hipotireoidismo, independente do estado funcional das gônadas, retarda o crescimento de tumores em camundongos, sem, contudo, alterar as características celulares de malignidade.

Verifica-se uma interação complexa entre diversos hormônios, que sugerem que o surgimento dos tumores mamários seja uma consequência desta interação. Os resultados que vem sendo apresentados são conflitantes, o que impede de determinar o possível papel da prolactina no surgimento e desenvolvimento dos tumores mamários caninos.

3. REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. A mecânica da divisão celular. In: **Biologia molecular da célula**. São Paulo: Artes médicas Sul, 1997. Cap. 18, p.911-946.
- ALLEN, S.; MAHAFFEY, E.A. Canine mammary neoplasia: prognostic indicators and response to surgical therapy. **Journal of the American Hospital Association**, v. 25, p. 540-546, 1989.
- BICALHO, S.R. **Quantificação sérica do marcador tumoral CA15.3 em cadelas híidas por quimioluminescência**.28f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2012.
- BUITRAGO, F.; UEMURA, G.; SENA, M. C. F. Fatores prognósticos em câncer de mama. **Comunicação em Ciências da Saúde**, n. 22, p.69-82, 2011.
- CAMPOS, L.C.; LAVALLE, G.E.; ESTRELA-LIMA, A.; MELGAÇO DE FARIA, J.C.; GUIMARÃES, J.E.; DUTRA, A.P.; FERREIRA, E.; SOUSA, L.P.; RABELO, E.M.L.; VIEIRA DA COSTA, A.F.D.; CASSALI, G.D. CA 15.3, CEA, and LH in dogs with malignant mammary tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.26, p.1383-1388, 2012.
- CARRUIDO, A. C. C.; SALAS Y.; ORLANDO, E.; MENDEZ, D. 2003.Incidencia de las neoplasias de glándula mamaria en caninos diagnosticadas por histopatología. Disponível em : <<http://www.monografias.com/trabajos15/tumores-caninos/tumores-caninos.html>> Acesso em: 05 jul. 2015.
- CARVALHO, T.B. **Neoplasias mamárias em cadelas: caracterização histopatológica e expressão de proteína de estresse (HSP 72)**. 2006. 35f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, MG.
- CASSALI, G. D., GOBBI, H., MALM, C., SCHMITT, F. C. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. **Cytopathology**, v.18, n.3, p.191-196, 2007.
- CASSALI, G.G.; LAVALLE, G.E.; DE NARDI, A.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A.C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A.C.; DALECK, C.R.; SALGADO, B.S.; FERNANDES,

C.G.; SOBRAL, A.C.; AMORIM, R.L.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; AULER, P.A.; MAGALHÃES, G.M.; SILVA, J.O.; RAPOSO, J.B.; FERREIRA, A.M.R.; OLIVERIA, L.O.; MALM, C.; ZUCCARI, D.A.P.C.; TANAKA, N.M.; RIBEIRO, L.R.; CAMPOS, L.C.; SOUZA, C.M.; LEITE, J.S.; SOARES, L.M.C.; CAVALCANTI, M.F.; FONTELES, Z.G.C.; SCHUCH, I.D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T.S.; TERRA, E.M.; CASTANHEIRA, T.L.L.; FELIZ, A.O.C.; CARVALHO, G.D.; GUIM, T.N.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S.C.; MAIA, F.C.L.; DAGLI, M.L.Z.; ROCHA, N.S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J.P.; SILVA, S.M.M.S.; BEZERRIL, J.E.; FREHSE, M.S.; PAES DE ALMEIDA, E.C.; CAMPOS, C.B. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.4, n.2, p. 153-180, 2011.

CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas- revisão. **Revista Clínica Veterinária**, ano XI, n. 61, p. 56- 63, 2006.

CHEUNG,K.L.; GRAVES,C.R.L.; ROBERTSON,J.F.R. Tumour marker measurements in the diagnostics and monitoring of breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**. v. 26, p. 91-102, 2000.

CIOCCA D. R., FANELLI M. A., Estrogen receptors and cell proliferation in breast cancer, **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.8, p.312–313, 1997.

COSTA S.D.; LANGE,S.; KLINGA, K.; MERKLE, E.; KAUFMANN, M. Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer. **European Journal of Cancer**, v.38, n.10, p1329-1334, 2002.

DALECK, C.RFRANCESCHINI, P.H., ALESSI, A.C., SANTANA, A.E., MARTINS, M.I.M. Aspectos clínico e cirúrgicos do tumor mamário canino. **Ciência Rural**, v. 28, n.1, p. 95-100, 1998.

DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A; MACEDO, T.R.; RODIGHERI, S.M.; RIOS, A.; PIEKARS, C.H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamento em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.15-26, 2002.

DEPES, D.B.; SOUZA, M. A.; RIBALTA, J. C. L.; ALVES, M.T. S.; KEMP, C.; LIMA, G. R. Alterações na expressão do antígeno nuclear de proliferação celular e dos receptores de estrogênio e de progesterona provocadas pela quimioterapia primária no carcinoma de mama. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, vol.25, n.8, 2003.

DUFFY, M. J. CA15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer. **Annals of Clinical Biochemistry**, London, v. 36, p. 579-586, 1999.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. 2004. **Canine and Feline endocrinology and reproduction**. 3 ed. Philadelphia: WB Saunders.

FELICIANO, M.A.R., SILVA, A.S., PEIXOTO, R.V.R., GALERA, P.D., VICENTE, W.R.R. Estudo clínico, histopatológico e imunoistoquímico de neoplasias mamárias em cadelas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.5, p.1094-1100, 2012.

FERGUSON, H.R Canine mammary tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v.15, p.502-511. 1985.

FERRI, S.T.S. Tumores mamários em fêmeas caninas e felinas: revisão de literatura. **A Hora Veterinária**, ano 22, n. 1 31 , p.64-67, 2003.

FONSECA, C. S; DALECK, C. R.. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, v.30, p. 731-5. 2000.

GRAHAM, J.D.; CLARKE, C.L. Physiological action of progesterone in target tissues. **Endocrine Reviews**. v.18, n.4, p.502-511, 1997.

GRUVBERGER-SAAL, S.K.; BENDAHL, P.O.; SAAL, L.H.; LAAKSO, M.; HEGARDT, C.; EDEN, P.; PETERSON, C.; MALMSTROM, P.; ISOLA, J.; BORG, A.; FERNO, M. Estrogen receptor beta expression is associated with tamoxifen response in ERalpha-negative breast carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v.13, p.1987-1994, 2007.

HAMPE, J. E.; MISDORP, W. Tumors and dysplasias of the mammary gland. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 50, p. 111-113, 1974.

HELGUERO, L.A.; LINDBERG, K.; GARDMO, C.; SCHWEND, T.; GUSTAFSSON, J.A.; HALDOSÉN, L.A. Different roles of estrogen receptors alpha and beta in the regulation of E-cadherin protein levels in a mouse mammary epithelial cell line. **Cancer Research**, v.68, n.2, p.8695-704, 2008.

HENDERSON B.E., ROSS R.K., PIKE M.C. Toward the primary prevention of cancer. **Science**, v.252, p.1131-1138, 1991.

HENDERSON, B.E.; FEIGELSON, H.S. Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.21, n.3, p.427-433, 2000.

HUBER, P. R.; BISCHOF, P.; KRETSCHMER, R.; TRUSCHNIG, M.; HALWACHS, G.; SCHMIDT, M. CA 15-3: a multicenter evaluation of automated and manual tests. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, Berlin, v. 34, p. 77–84, 1996.

JACOBS, E.L.; HASKELL, C.M. Clinical use of tumor markers in oncology. **Current Problems in Cancer**, v. 15, n.6, p.299-360, 1991.

JARDINI, F.H.M. **Avaliação dos marcadores CEA e CA15-3 no soro e CEA no tumor e linfonodos excisados de cadelas portadoras de neoplasia mamária**. 2003. 44f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, SP.

JOHNSTON S. D. Reproductive systems. In: Slatter D. (Ed). **Textbook of Small Animal Surgery**. 2nd edn. Philadelphia: Saunders, p. 2177-2199,1993.

KOJIMA H., FUKAZAWA, Y.; SATO, T.; ENARI, M.; MATSUZAWA, A.; TSUNODA, S.; NAGASAWA, H.; OHTA, Y.; IGUCHI, T. Apoptosis of pregnancy-dependent mammary tumor and transplantable pregnancy-dependent mammary tumor in mice. **Cancer Letter**, v.110, p.113-121, 1996.

KOLB, E. Fisiologia da glândula mamária. In: KOLB, E. **Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. p. 413-4.

KUIPER, G.G.J.M.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M., NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J-AR. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 93, p.5925–5930, 1996.

MANUALI, E.; GIUSEPPE, A.; FELIZIANI, F.; FORTI, K.; CASCIARI, C.; MARCHESI, M.C.; PACIFICO, E.; PAWLOWSKI, K.M.; MAJCHRZAK, K.; KRÓL, M. CA 15-3 cell lines and tissue expression in canine mammary cancer and the correlation between serum levels and tumour histological grade. **BMC Veterinary Research**, v.8, n.86, p. 246-261, 2012.

MARCHESI, M.C.; MANUALI, E.; PACIFICO, E.; FERRI, C.; ROMAGNOLI, M.; MANGILI, V.; FRUGANTI, G. Cancer antigen 15/3: possible diagnostic use in veterinary clinical oncology. Preliminary study. **Veterinary Research Communications**, n.34, supl. 1, p. 103-106, 2010.

MARTINS, L.R.; LOPES, M.D. Pseudociese canina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, p.137-41. 2005.

McGAVIN, M.D., ZACHARY, J.F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, 1475p.

MIALOT, J. P. **Tumores Mamários da Cadela**. In: _____. Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos. Porto Alegre: A Hora Veterinária, 1998. p. 131-138.

MIDSORP, W. Tumors of the mamary gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4ed. Iowa: Iwoa State Press, 2002. Cap.12, p.575-606.

MILANTA, F.; CALANDRELLA, M.; BARI, G. et al. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic and neoplastic canine and feline mammary tissues. **Research in Veterinary Science**, v.79, p.225-232, 2005.

MONLUX, A. W.; ROSZEL, J. F.; McUcam, D. W.; PALMER, T. W. Classification of epithelial canine ,mammary tumors in a defined population. **Veterinary Pathology**, v. 14, p. 194-217, 1977.

MORRISSON, W.B. **Canine and feline mammary tumors**. In: Morriison W.B. (Ed). Cancer in dogs and cats - medical and surgical management. Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 591-598, 1998.

MOSSELMAN, S.; POLMAN, J.; DIJKEMA, R. ER- β : identification and characterization of a novel estrogen receptor. **FEBS Letter**, v. 392, p. 49-53, 1996.

MOULTON, J.E. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. 3.ed. Berkeley :University of California, 1990. p.672.

MULDOON, T.G. Interplay between estradiol and prolactin in the regulation of steroid hormone receptor levels, nature, and functionality in normal mouse mammary tissue. **Endocrinology**, v.109, n.5, p.1339-1346, 1981.

NOGUEIRA, C.R.; BRENTANI, M.M. Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines. **Journal Steroid Biochemical and Molecular Biology**, v.59, n.3/4, p.271-279, 1996.

NORMAN A.W., LITWACK G. **Hormones**. 2.ed. San Diego: Academic, 1997. 558p.

NOVOSAD, C. A. Principles of Treatment for Mammary Gland Tumors. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.18, p.107-9. 2003.

OGAWA S, INOUE S, WATANABE T, HIROI H, ORIMO A, HOSOI T, OUCHI Y, MURAMATSU M. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.243, p.122-126, 1998.

OLIVEIRA FILHO, J.C.; KOMMERS, G.D.; MASUDA, E.K.; MARQUES, B.F.M.P.P.; FIGHERA, R.A.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.L.S. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 30, n.2, p.177-185, 2010.

OLIVEIRA, L.O.; OLIVEIRA, R.T.; LORETTI, L.P.; RODRIGUES, R.P.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.31, n.2, p. 105-110, 2003.

PELETEIRO, M.C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, vol. LXXXIX, n. 509, p. 10-29, 1994.

PEREZ, M., PEÑA, L.; DEL CASTILLO, N.; NIETO, I. 2000. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. **Journal of Small Animal Practice**, p.41-48, 2000.

PHILIBERT, J. C., SNYDER, P. W., GLICKMAN, N., GLICKMAN, L. T., KNAPP, D. W. E WATERS, D. J. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. 17:102-106, 2003.

QUEIROGA F.; LOPES C. Tumores mamários caninos: novas perspectivas. **Anais Congresso de Ciências Veterinárias**, p.183-190, 2002.

QUEIROGA, F.L.; PÉREZ-ALENZA, M.D.; SILVAN, G.; Peña, L.; LOPES, C. S.; ILLERA, J.C. Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17 β -

estradiol) in canine mammary tumours. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v.110, n.1-2, p.76-82, 2008.

RAMOS, R.S.; AVANSI, B.R.; VOLPATO, R.; PIGNATON, W. CASTAN, E.P.; COSTA, F.A.A.; LOPES, M.D. Expressão gênica dos RE α , RE β , e PR em tumores mamários de cadelas por meio do q-PCR. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V. 64, n.6, p.1471-1477, 2012.

RÊGO, M. S. A. **Caracterização do perfil clínico, laboratorial, citológico e histopatológico em cadelas portadoras de tumor da mama submetidas à mastectomia**. 2012. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012.

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MacEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland In: WITHROW, S.J.; MacEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**, Philadelphia, p.455-77. 2001.

SARTIN, E.A., BARNES, S., KWAPIEN, P., WOLFE, L.G. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, n.2, p.2196- 2200, 1992.

SCHMITT, F.C. Mama. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia**, Rio de Janeiro, p. 538-62. 2000.

SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; CSSALI, G.D. C. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v. 34, n.2, p.625-633, 2004a.

SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; FERREIRA, E.; MORAES, J.R.C.; OCARINO, N.M.; CASSALI, G.D. Efeito do hipotireoidismo no tumor de Ehrlich sólido em camundongos fêmeas castradas e não castradas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo , v. 48, n. 6, p. 867-874, 2004b.

SMYTH, P.P.A. The thyroid and breast cancer: a significant association ? In: **The Finnish Medical Society**. *Ann Med*, v.29, p.189-191, 1997.

SOARES, C.T.; FREDERIGUE-JUNIOR, U.; DE LUCA, L.A. Anatomopathological Analysis of Sentinel and Nonsentinel Lymph Nodes in Breast Cancer: Hematoxylin-Eosin

Versus Immunohistochemistry. **International Journal of Surgical Pathology**. V.15, n. 4, p. 358-368, 2007.

SONNENSCHNEIN, E.G.; GLICKMAN, L.T.; GOLDSCHMIDT, M.H.; McKEE, L.J. Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: A case-control study. **American Journal of Epidemiology**, v.133, p.694–703. 1991.

SORENMO, K.U., KRISTIANSEN, V.M., COFONE, M.A., SHOFRER, F.S., BREEN, A.M., LANGELAND, M., MONGIL, C.M., GRONDAHL, A.M., TEIGE, J., GOLDSCHMIDT, M.H. Canine mammary gland tumors: a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.7, n. 3, p.162-172. 2009.

SOUZA, J. V. Marcadores mucinosos associados ao câncer. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 46, n. 1-2, p. 70-83, 2002.

STRATMANN, N.; FAILING, K.; RICHTER, A.; WEHREND, A. Mammary Tumor Recurrence in Bitches After Regional Mastectomy. **Veterinary Surgery**, v.37, p.82-6. 2008.

SUTHERLAND R. L., PRALL O. W., WATTS C. K.. Estrogen and progestin regulation of cell cycle progression, **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.3, p.63–72 1998.

THEODOSSIOU, C.; SCHWARZENBERGER, P. Propylthiouracil reduces xenograft tumor growth in an athymic nude mouse prostate cancer model. **The American Journal of the Medical Sciences**, n.310, p.96-99. 2000.

TORÍBIO, J. M. M. L.; LIMA, A. E.; MARTINS FILHO, E. F.; RIBEIRO, L. G. R.; D'ASSIS, M. J. M. H.; TEIXEIRA, R. G.; DAMASCENO, K. A.; CASSALI, G. D.; COSTA NETO, J. M. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. **Revista Ceres**, n. 59, v.4, p. 427-433, 2012,

VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K. Prolactin and anti-prolactinic agents in the pathophysiology and treatment of mammary tumors in the dog. **Proceedings of the North American Veterinary Conference**, v.7, p.7-11, 2006.

WALKER, R.A. Estrogen receptor and its potential role in breast cancer development. **The Journal of Pathology**, n. 188:229-230, 1999.

WEISS, H.A.; BRINTON, L.A.; POTISCHMAN, N.A.; BROGAN, D.; COATES, R.J.; GAMMON, M.D. Breast cancer risk in young women and history of selected medical conditions. **International Journal of Epidemiology**, n.28, p.816-826.1999.

YANG, W-I., EFIRD, J.T.; QUINTANILLA-MARTINEZ, L.; NANCY, L.H. Cell kinetic study of thymic epithelial tumors using PCNA (PC10) and Ki67 (MIB-1) antibodies. **Human Pathology**, v.27, n. 1, p. 70-76, 1996.

ZUCCARI D.A.P.C., SANTANA, A.E., ROCHA, N.S. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas – revisão. **Clínica Veterinária**, n.32, p.50-4, 2001.

ARTIGO 1

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico “Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia”

1 **Caracterização clínica e histopatológica de neoplasias mamárias em cadelas**

2 **Clinical and histopathological characterization of mammary neoplasms in bitches**

3 P. B. Araújo^{1*}; A. K. R. Mota¹; M. O. Sampaio²; E. N. Silva³, F. S. Mendonça⁴;

4 J. Evêncio-Neto⁵

5 ^{1*}Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade
6 Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. E-mail: priscillaaraujo@live.com.

7 ² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade
8 Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

9 ³ Médica Veterinária autônoma.

10 ⁴Professor Adjunto do do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da
11 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

12 ⁵Professor Titular do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade
13 Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

14
15 **RESUMO:** Objetivou-se realizar um estudo a partir dos dados de exame clínico e
16 histopatológico, caracterizando casos de neoplasias mamárias caninas. Foram utilizadas
17 30 cadelas portadoras de tumores mamários. Os animais foram submetidos a exame
18 clínico, hemograma e exames de imagem e os tutores submetidos a um questionário
19 para investigação de fatores de risco. As pacientes foram encaminhadas à cirurgia, onde
20 se realizou coleta de fragmentos de tumor e de linfonodos para realização de exame
21 histopatológico. Os dados foram agrupados de acordo com cada variável observada e as
22 frequências absolutas e relativas comparadas entre si. As neoplasias mamárias mais
23 frequentes foram malignas (76,7%), destacando-se o carcinossarcoma (36,7%). As
24 neoplasias foram mais frequentes em fêmeas com idade entre 6 e 10 anos (63,3%), com
25 tamanho tumoral superior a 5 cm (56,7%), localizadas nas mamas abdominais. Os
26 tutores relataram que 56,7% das cadelas não apresentaram sinais de pseudociese, 63,3%
27 não haviam passado por gestação anterior, 76,7% não haviam feito uso de
28 anticoncepcionais, e 90% não haviam sido castradas. Todas as neoplasias que se
29 apresentaram vascularizadas eram de natureza maligna, e as ulcerações estiveram
30 presentes em 73,9% dos tumores malignos. Verificou-se ainda que as cadelas nulíparas
31 apresentam maior risco de desenvolvimento de neoplasias malignas. Conclui-se que
32 fatores prognósticos tradicionalmente relacionados ao surgimento dos tumores
33 mamários caninos não tiveram impacto na ocorrência dos tumores observados, enquanto
34 outros fatores epidemiológicos cujos dados na literatura ainda são conflitantes, foram

35 relacionados ou ao surgimento das neoplasias de forma geral, ou mais especificamente
36 ao surgimento das neoplasias malignas.

37 **Palavras-chave:** cadelas, fator de risco, prognóstico, sobrevida, tumor de mama.

38

39 **ABSTRACT:** The present objective was to perform an analysis of the clinical and
40 histopathological data from cases involving mammary tumors. Thirty bitches with
41 mammary tumors were selected. A physical exam, hemogram, and diagnostic imaging
42 were performed. The owners were given a questionnaire for investigation of risk factors.
43 Afterwards, the patients were taken to surgery, where fragments of the tumor and lymph
44 nodes were collected for histopathology. Data were grouped according to each observed
45 variable and the absolute and relative frequencies for each were compared. The most
46 common mammary neoplasms were malignant (76.7%), of which the carcinosarcoma
47 was most common (36.7%). Neoplasms were more frequent in bitches between 6 and 10
48 years (63.3%), with tumor size greater than 5 cm (56.7%), located in the abdominal
49 mammary glands. Owners reported that most bitches did not show signs of
50 pseudocyesis (56.7%), were not spayed, nor used contraceptives. All neoplasms with
51 vascularization were malignant in nature, and ulcerations were present in 73.9% of
52 malignant neoplasms. It was also observed that nulliparous bitches have a greater risk of
53 developing malignant neoplasms. It can be concluded that the prognostic factors
54 traditionally associated with canine mammary tumors did not have an impact on the
55 occurrence of the these tumors, while other epidemiological factors with still conflicting
56 reports in the literature were related to either the development of neoplasms in general,
57 or more specifically to the development of malignant neoplasms.

58 **Keywords:** bitches, risk factor, prognosis, survival, mammary tumor.

59 **INTRODUÇÃO**

60 Em cadelas, as neoplasias malignas de mama são as mais comuns (Midsorp,
61 2002), e dada à frequência com que surgem na rotina veterinária e importância que os
62 cães possuem como animais de companhia, o estudo dos tumores de mama e dos fatores
63 de risco relacionados ganha destaque na clínica veterinária (Fonseca e Daleck, 2000).
64 Somado à importância clínica, há o fato das neoplasias mamárias caninas se
65 apresentarem como modelo de estudo para as neoplasias mamárias em mulheres devido
66 às semelhanças epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas (Feliciano et al., 2012).

67 Apesar dos estudos realizados, a etiologia do câncer mamário permanece
68 desconhecida, mas provavelmente é resultado de uma interação entre susceptibilidade
69 genética e fatores circundantes sejam eles ambientais, nutricionais ou hormonais
70 (Zucarrì et al., 1999). Neste contexto, os dados de exame clínico e anamnese, como
71 idade ao aparecimento da doença, ocorrência de pseudociese, administração de
72 anticoncepcionais, tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos podem estar
73 relacionados ao grau de malignidade da neoplasia, e assim trazer importantes
74 informações no estabelecimento do prognóstico da doença, contribuindo na melhora da
75 qualidade da sobrevivência do paciente (Oliveira Filho et al., 2010, Ferro et al., 2013).

76 Os tumores malignos de origem epitelial são os mais frequentes (Ramos et al.,
77 2012). Dentre estes, os carcinomas, tumores mistos benignos e tumores mistos malignos
78 são citados como os mais frequentes (Moulton, 1990; Daleck et al., 1998; Oliveira et al.
79 2003). A diversidade dos tipos histológicos dificulta a classificação e confere aos
80 tumores mamários caninos um comportamento biológico inesperado. Assim, o estudo
81 de fatores clínicos e patológicos que possuam significado prognóstico é uma linha de
82 pesquisa promissora na medicina veterinária.

83 A crescente incidência, a evolução complexa, e o comportamento variável dos
84 tumores de mama em cadelas despertam interesse especial no estudo da patologia em
85 questão, e nesse contexto, variáveis clínicas podem trazer informações importantes, que
86 auxiliam na compreensão do comportamento biológico tumoral e na escolha de uma
87 conduta terapêutica adequada (Misdorp, 2002). Deste modo, o estudo dos fatores de
88 risco relacionados pode trazer informações relevantes no que diz respeito aos principais
89 grupos que podem ser afetados, bem como o estudo de fatores clínicos é importante
90 para prever o comportamento dos neoplasmas.

91 Assim, o objetivo deste trabalho é caracterizar os casos de neoplasias mamárias
92 em cadelas a partir dos dados de exame clínico, exames laboratoriais, de imagem, e
93 exame histopatológico, analisando os fatores de risco relacionados ao surgimento das
94 neoplasias.

95 **MATERIAL E MÉTODOS**

96 Foram utilizadas 30 cadelas de diferentes idades e raças portadoras de neoplasias
97 mamárias, atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de

98 Pernambuco (HOVET – UFRPE). O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de
99 Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRPE, com licença de número 055/2015.

100 Os animais participantes do estudo foram submetidos a exame clínico,
101 hemograma e exames de imagem (radiografia de tórax e ultrassonografia de abdômen).
102 Estes últimos foram indicados para investigação de metástase pulmonar e abdominal,
103 respectivamente, somando-se ainda a avaliação da vascularização da neoplasia, através
104 da ultrassonografia. Os animais portadores de metástases em órgãos torácicos ou
105 abdominais não foram incluídos no estudo. Os tutores dos animais participantes da
106 pesquisa responderam um questionário sobre fatores epidemiológicos que pudessem
107 influenciar de alguma forma o processo neoplásico.

108 A partir dos resultados obtidos através de exame clínico das pacientes e do
109 questionário respondido pelos tutores, os animais foram distribuídos em grupos de
110 acordo com ocorrência de pseudociese, nuliparidade, uso de anticoncepcionais,
111 castração anterior à mastectomia, tempo de evolução da neoplasia, tamanho e
112 localização das neoplasias, presença de ulcerações e número de glândulas acometidas
113 num mesmo animal.

114 Quanto à idade, os cães foram agrupados em grupos: jovens (menos de cinco
115 anos), adultos (de seis a dez anos) e idosos (onze anos ou mais). Quanto ao tamanho dos
116 tumores, esses foram agrupados de acordo com o sistema TNM (Misdorp, 2002), no
117 qual T1 são tumores menores do que 3 cm, T2 são tumores com 3-5cm e T3 são
118 tumores maiores do que 5 cm. Realizou-se também o estadiamento clínico, de acordo
119 com Misdorp (2002).

120 Após realização dos exames mencionados anteriormente os animais foram
121 encaminhados para a cirurgia de mastectomia cuja técnica foi escolhida de acordo com
122 localização e número de neoplasias na cadeia mamária de cada paciente. Durante o
123 procedimento, realizou-se coleta dos linfonodos inguinais e tecido mamário neoplásico
124 para realização de exame histopatológico, que foram fixados em formol neutro
125 tamponado a 10%. Finalizada a fixação, os fragmentos de tumor e linfonodos foram
126 conservados em álcool etílico a 70%. Em seguida, foram desidratados em concentrações
127 crescentes de álcool, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina
128 histológica líquida a 59 °C. Posteriormente os blocos foram cortados a 5 µm em
129 micrótomo semi-automático tipo Minot. As lâminas foram coradas pela hematoxilina-

130 eosina e observadas em microscópio óptico biológico Trinocular NIKON 50i, acoplado
 131 a um sistema de câmera digital usado para capturar imagens microscópicas. A
 132 classificação histológica das neoplasias foi feita de acordo com Cassali et al. (2011).

133 Depois de agrupados de acordo com as variáveis anteriormente relacionadas,
 134 verificaram-se as frequências absolutas e relativas. Realizou-se uma análise univariada
 135 através do teste de Qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher tendo como variável
 136 dependente o tipo de tumor (maligno ou benigno). O programa IBM SPSS Statistics
 137 23.0 foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos e o nível de significância
 138 adotado foi de 5,0%.

139 RESULTADOS E DISCUSSÃO

140 Na tabela 1 estão apresentados os principais tipos de neoplasias mamárias
 141 observados nas cadelas participantes do nosso estudo.

142 **Tabela1.** Frequências dos tipos histológicos em cadelas portadoras de neoplasias mamárias.

Tipo de tumor	FA	FR%
Adenoma	4	13,3%
Adenoma complexo	2	6,7%
Carcinoma anaplásico	1	3,3%
Carcinoma complexo	2	6,7%
Carcinoma mucinoso	1	3,3%
Carcinoma sólido	3	10,0%
Carcinoma tubular	4	13,4%
Carcinossarcoma	11	36,7%
Fibroadenoma	1	3,3%
Osteossarcoma	1	3,3%
Total	30	100,0%

143 FA- Frequência absoluta; FR- Frequência relativa.

144 Verificou-se que as neoplasias malignas foram as mais frequentes (76,6%),
 145 destacando-se o carcinossarcoma (36,7%) dentre as lesões malignas (Tab.2). As
 146 informações do exame clínico, como formato irregular, diâmetro, presença de ulceração,
 147 aderência e acometimento de linfonodo, que podem caracterizar um processo maligno
 148 (Ramos et al., 2012), entretanto não são suficientes para determinar a conduta clínica ou
 149 estabelecer o prognóstico, sendo fundamental a realização do exame histopatológico
 150 (Schmitt, 2000).

151 De acordo com Queiroga e Lopes (2002) 52% dos tumores mamários caninos
 152 são malignos. Oliveira et al. (2003) observaram uma frequência de 71,8% de
 153 neoplasias malignas. Este resultado é semelhante ao nosso, no qual 76,6% das fêmeas
 154 eram portadoras de tumores malignos. Outros autores também vêm relatando
 155 frequências semelhantes às aqui encontradas (Ramos et al., 2012; Ferro et al., 2013). A
 156 maior presença de neoplasias malignas, por vezes está associada à demora na

157 apresentação dos pacientes, visto que tumores benignos podem se tornar malignos com
158 a evolução do tempo de duração do processo (Sorenmo et al., 2009). A maioria dos
159 proprietários (56,7%) relataram que já haviam observado os tumores há mais de 1 ano
160 (Tab.2), entretanto, só procuraram acompanhamento Veterinário após aceleração no
161 crescimento ou ulceração da neoplasia.

162 A demora na apresentação do paciente oncológico ao médico veterinário resulta
163 num avanço do estadiamento clínico pela malignização dos tumores, o que por vezes
164 está relacionado a características como aumento do tamanho do tumor, ocorrência de
165 metástases, presença de ulcerações entre outros (Daleck et al., 1998). O diagnóstico
166 precoce altera favoravelmente a história natural da doença, reduz a mortalidade e
167 possibilita o uso de tratamentos menos agressivos (Toríbio et al., 2012).

168 Associados, tais sinais relacionam-se com um prognóstico reservado e
169 diminuição do tempo de sobrevida das pacientes, assim, a caracterização dos casos pode
170 contribuir na predição do comportamento clínico do tumor, e contribuir no melhor
171 entendimento da evolução do processo neoplásico.

172 Dentre os tumores malignos, os carcinossarcomas foram os mais frequentes.
173 Outros autores encontraram os carcinomas e tumores mistos malignos com maior
174 frequência (Daleck et al., 1998; Oliveira et al., 2003). De acordo com Oliveira et al.
175 (2003), os tumores de origem epitelial são os mais frequentes entre as neoplasias
176 mamárias. Em nosso trabalho a neplasia maligna mais frequente tem origem mista,
177 entretanto, somando-se os outros tipos tumorais observados, verificamos que os
178 carcinomas, de forma geral, tiveram frequência semelhante a do carcinossarcoma.

179 A identificação do tipo tumoral é considerada um fator indepente na
180 determinação do prognóstico. Os carcinossarcomas são extremamente variáveis, com
181 crescimento rápido, composto por células que morfológicamente lembram células
182 epiteliais. Macroscopicamente são bem delineados, com área de tecido ósseo que se
183 apresenta ao corte. Quando comparados aos demais carcinomas, os carcinossarcomas
184 tem um prognóstico ruim (Cassali et al., 2011).

185 Em 23,3% dos animais foram observados tumores benignos, com maior
186 frequência do adenoma (13,3%), que é caracterizado pela presença de células epiteliais
187 bem diferenciadas (Cassali et al., 2011). Apesar de Midosrp (2002) afirmar que os
188 adenomas são neoplasias raras em cães, outros autores observaram frequências

189 semelhantes: Oliveira et al. (2003) verificarem que 11,8% das cadelas eram portadoras
 190 de adenomas e Oliveira Filho et al. (2010) observarem uma frequência de 14,58%.
 191 Contrariamente ao observado, Feliciano et al. (2012) observaram os tumores mistos
 192 benignos como os mais frequentes, assim como Queiroga e Lopes (2002).

193 Verifica-se grande variação morfológica de tipos histológicos entre as neoplasias
 194 mamárias caninas, que podem ser resultado das diferentes classificações morfológicas
 195 propostas (Hampe e Misdorp, 1974; Monlux et al., 1977; Midsorp, 2002; Cassali et al.,
 196 2011) . As divergências nos levantamentos epidemiológicos dificultam a comparação
 197 dos dados e a predição do comportamento biológico dos tumores de mama em cães.

198 **Tabela 2.** Frequências absoluta e relativa das características clínicas observadas em cadelas portadoras de neoplasias mamárias.

Aspectos clínicos gerais	Maligno		Benigno		Total	
	FA	FR	FA	FR	FA	FR
<i>Raça</i>						
SRD	11	47,8	5	71,4	16	53,3
Poodle	7	30,4	1	14,3	8	26,7
Outras	5	21,7	1	14,3	6	20,0
<i>Tamanho</i>						
Menor que 3 cm	4	17,4	2	28,6	6	20
3 a 5 cm	5	21,7	2	28,6	7	23,3
Maior que 5 cm	14	60,9	3	42,9	17	56,7
<i>Ulceração</i>						
Presente	6	26,1	0	0	6	20
Ausente	17	73,9	7	100	24	80
<i>Tempo de evolução</i>						
Menos de 1 ano	11	47,8	2	28,6	13	43,3
Mais de 1 ano	12	52,2	5	71,4	17	56,7
<i>Estadiamento clínico</i>						
I	3	13,0	2	28,6	5	16,7
II	4	17,4	2	28,6	6	20
III	10	43,5	3	42,9	13	43,3
IV	6	26,1	0	0	6	20
<i>Vascularização</i>						
Sim	9	39,1	0	0,0	9	30
Não	14	60,9	7	33,3	21	70
<i>Metástase em linfonodos</i>						
Presente	6	26,1	0	0,0	6	20
Ausente	17	73,9	7	100	24	80
<i>Tumores únicos/múltiplos</i>						
Múltiplos	15	65,2	2	28,6	17	56,7
Únicos	8	34,8	5	71,4	13	43,3

199 FA: frequência absoluta; FR: frequência relativa; SRD: sem raça definida.

200 As metástases em linfonodos foram observadas em 26,1% das cadelas
201 portadoras de neoplasias malignas (Tab.2). Oliveira Filho et al. (2010) observaram uma
202 frequência semelhante, com metástases em linfonodos em 29,5% em cadelas portadoras
203 de neoplasias malignas que foram necropsiadas. Apesar da importância do exame dos
204 linfonodos palpáveis, em poucos estudos clínicos foram observadas informações a
205 respeito da pesquisa de metástase nessas estruturas.

206 O exame dos linfonodos pode ser facilmente realizado pela técnica de citologia
207 aspirativa com agulha fina, com alta sensibilidade e especificidade, sendo recomendado
208 para investigação de metástases (Cassali et al., 2011). Os resultados, quando associados
209 à presença de metástases, estão relacionados a uma queda na expectativa de sobrevivência
210 (Sonrenmo, 2003). A invasão e a metástase são características importantes dos tumores
211 malignos e influenciam diretamente no prognóstico (Magalhães, 2010). Assim, os
212 resultados encontrados confirmam a importância do exame dos linfonodos, e enfatizam
213 a necessidade da sua incorporação à rotina veterinária, e como os resultados podem ser
214 úteis na avaliação do paciente.

215 Quanto ao padrão racial (Tab. 2), observou-se que 53,3% das pacientes eram
216 animais sem raça definida (SRD). Contrariamente aos resultados observados, Santos et
217 al. (2010) afirma que as neoplasias mamárias tendem a ser mais comuns em cadelas de
218 raça pura, sugerindo que a endogamia pode aumentar o risco desta neoplasia. Quando
219 são realizadas comparações entre raças, é necessário levar em consideração fatores
220 influentes como a quantidade de raças prevalentes em regiões geográficas, a inclusão de
221 novas raças e desaparecimento de outras (Magalhães, 2010). Toríbio et al. (2012)
222 afirmam que os animais sem raça definida representam a maior parte da população canina
223 no Brasil. Assim, sobretudo por se tratar de um estudo realizado em um hospital escola
224 que atende principalmente a população de baixa renda, a maior frequência de animais
225 SRD como portadores de neoplasias mamárias apenas reflete as características da
226 população estudada, não sendo possível determinar uma maior predisposição ao
227 aparecimento de tumores mamários no que diz respeito ao padrão racial.

228 Quanto à faixa etária, verificou-se que 63,3% das cadelas possuíam idade entre 6
229 e 10 anos, e 36,7% possuíam idade superior a 11 anos. A média de idade das pacientes
230 foi de $10 \pm 2,6$ anos. Oliveira Filho et al. (2010) em seu estudo verificou que as cadelas
231 idosas também foram as mais acometidas, com média de idade de 9,2 anos, e que,

232 dentre estas, os tipos tumorais malignos foram mais frequentes. De acordo com Philbert
233 et al. (2003), não foram demonstrados na veterinária, estudos que apontem diferenças
234 consistentes no prognóstico dos animais com base na idade, contudo, em humanos,
235 mulheres com idade inferior a 30 anos ou superior a 60 apresentam prognóstico
236 desfavorável.

237 O aparecimento do tumor de mama em cadelas aumenta significativamente com
238 a idade, observando-se maior susceptibilidade entre os seis e os doze anos de idade
239 (Cassali, 2011), o que concorda com os resultados aqui observados. Segundo Fonseca e
240 Daleck (2000) a ocorrência de neoplasias mamárias em cadelas idosas é mais comum
241 devido ao maior tempo de exposição aos fatores de risco ambientais, e, principalmente,
242 hormonais.

243 Com relação ao tamanho das neoplasias, observou-se que 20% possuíam
244 tumores menores que três centímetros, 23,3% possuíam tumores com tamanho variando
245 entre três e cinco centímetros e 56,7% possuíam tumores maiores que 5 centímetros. De
246 acordo com Queiroga e Lopes (2002), os tumores malignos apresentam na maioria dos
247 casos tamanhos superiores a 5 centímetros, com aderências a planos profundos,
248 podendo apresentar por vezes, ulceração cutânea e metástases. Quanto à presença de
249 ulceração, 20% dos tumores apresentavam-se ulcerados. As características de ulceração
250 e aderência a tecidos vizinhos estão relacionadas às neoplasias malignas (Schmitt,
251 2000).

252 Observou-se também que 40% (12) das pacientes eram portadoras de tumores
253 múltiplos, enquanto 60% (18) possuíam tumores únicos. De acordo com Lana et al.
254 (2007) aproximadamente 50% dos casos de tumores mamários caninos aparecem em
255 consulta, devido à rapidez da evolução tumor, e também ao adiamento na apresentação
256 dos animais à avaliação clínica. Ressalta-se que, nos casos dos tumores mamários
257 múltiplos, podem ocorrer diferentes tipos histológicos em uma ou mais glândulas
258 mamárias e aquele de pior prognóstico determinará a evolução clínica (Cavalcanti e
259 Cassali, 2006).

260 Dentre os tumores únicos, 55,6% (10) eram localizados nas glândulas
261 abdominais. Contrariamente, os resultados de Feliciano et al. (2012) mostraram que as
262 glândulas inguinais foram as mais acometidas, enquanto Lana et al. (2007) observou
263 que os tumores foram mais frequentes nas glândulas abdominais caudais e inguinais. A

264 justificativa para tal achado está relacionada à maior presença de parênquima nas
 265 glândulas mencionadas, e, conseqüentemente a maior abundância de receptores
 266 hormonais, o que favorece a ocorrência das neoplasias (Queiroga e Lopes, 2002).

267 No que diz respeito à alimentação, 36,7% dos tutores afirmaram oferecer aos
 268 seus animais apenas ração, 60% ofereciam ração e comida caseira, e 3,3% ofereciam
 269 apenas comida caseira (Tab. 3). Trabalhos relatam que a alimentação caseira, quando
 270 associada à alta ingestão de carnes bovina, suína e de gordura animal, estão relacionadas
 271 com a obesidade, que, por sua vez, relaciona-se ao desenvolvimento das neoplasias
 272 mamárias, assumindo papel promotor da carcinogênese (Motta, 2008).

273 De acordo com Philbert et al. (2003) a obesidade pode predispor a uma maior
 274 concentração de estrógeno circulante, o que favoreceria a proliferação de células
 275 epiteliais com receptores para estes hormônios. Em seu trabalho, Toríbio et al.)
 276 verificaram uma relação positiva entre a ingestão de comida caseira e os casos de
 277 neoplasia. Contudo, é importante ressaltar que as informações presentes na literatura a
 278 respeito da associação entre alimentação, obesidade e o surgimento de neoplasias
 279 mamárias ainda são pouco consistentes, inclusive sobre os fatores alimentares que
 280 podem estar relacionados, o que sugere a realização de estudos para melhor
 281 investigação dos resultados obtidos.

282 **Tabela 3.** Análise univariada dos fatores associados ao tipo de tumor (maligno e benigno)

VARIÁVEIS	TIPO DE TUMOR				TOTAL		OR	Valor P
	Maligno		Benigno		F.A.	F.R.(%)		
	F.A.	F.R. (%)	F.A.	F.R.(%)				
Alimentação								
Ração	8	72,7	3	27,3	11	100,0	-	0,813 ^(A)
Comida caseira	1	100,0	0	0,0	1	100,0	**	
Ambos	14	77,8	4	22,2	18	100,0	1,3 (0,2-7,4)	
Anticoncepcional								
Sim	5	71,4	2	28,6	7	100,0	-	1,000 ^(B)
Não	18	78,3	5	21,7	23	100,0	1,4 (0,2-9,8)	
Gestação⁺								
Sim	4	44,4	5	55,6	9	100,0	-	0,019^{(B)*}
Não	17	89,5	2	10,5	19	100,0	10,6 (1,5-76,1)	
Idade								
Adulto	6	66,7	3	33,3	9	100,0	-	0,640 ^(B)
Velho	17	80,9	4	19,1	21	100,0	2,1 (0,3-12,4)	
Mastectomia								
Sim	3	100,0	0	0,0	3	100,0	**	1,000 ^(B)
Não	20	74,1	7	25,9	27	100,0		
OSH								
Sim	2	66,7	1	33,3	3	100,0	-	1,000 ^(B)
Não	21	77,8	6	22,2	27	100,0	1,7 (0,1-38,6)	
Pseudociese								
Sim	11	84,6	2	15,4	13	100,0	2,3 (0,3-28,0)	0,426 ^(B)
Não	12	70,6	5	29,4	17	100,0	-	

283 ^(A) Teste de Qui-quadrado; ^(B) Teste de Exato de Fisher; F.A.- Frequência absoluta; F.R.- Frequência relativa; *Associação
 284 significativa ao nível de 5%; + Base de dados diferentes; ** Indefinido

285

286 A grande maioria das cadelas (90%) não havia sido submetida à castração
287 anterior à mastectomia. De forma semelhante, Oliveira Filho et al. (2010) verificou que
288 apenas 9,4% das cadelas haviam sido submetidas à castração prévia à exérese tumoral.
289 Ramos et al. (2012) verificaram em seu trabalho que 96% das cadelas que apresentavam
290 tumores mamários não eram castradas, contudo, não verificou influência da ausência de
291 castração no grau de malignidade das lesões. Em cadelas, a longa fase folicular no
292 período de estro pode favorecer o desenvolvimento de neoplasias, e a castração
293 realizada antes do terceiro cio diminui comprovadamente a incidência (Fonseca e
294 Daleck, 2000). Assim, observa-se mais uma vez o efeito protetor da ovariectomia em
295 animais jovens, uma vez que a presença de neoplasias foi maior em cadelas inteiras. Em
296 nossos resultados, a não realização da OSH prévia à mastectomia não esteve relacionada
297 ao tipo tumoral (se maligno ou benigno).

298 Os tutores dos animais relataram ainda que 43,3% (13) das fêmeas já haviam
299 apresentado características de pseudociese, enquanto 56,7% (17) não apresentavam tais
300 sinais (Tab.3). Oliveira Filho et al. (2010) observaram que em 2,9% dos casos as
301 pacientes apresentaram pseudociese. É importante considerar também que a avaliação
302 da pseudogestação através do uso de questionários resulta em respostas subjetivas, uma
303 vez que alguns tutores podem não ter detectado a ocorrência de sinais de pseudociese
304 em suas cadelas, o que alteraria o resultado encontrado. Todavia, de acordo com Zuccari
305 et al. (1999), em animais com essa condição, os níveis de prolactina são altos, o que
306 predispõe à formação de tumores, associado ao fato de que o leite retido cronicamente
307 pode conter compostos químicos que possuam efeito carcinogênico sobre o epitélio
308 mamário.

309 Quanto ao uso de anticoncepcionais, 23,3% dos tutores afirmaram ter ministrado
310 de drogas anticoncepcionais, e 76,7% afirmaram que não usavam em seus animais este
311 tipo de medicamento. Oliveira Filho et al. (2010) afirmam que em 9,2% dos casos foi
312 informado o uso de contraceptivos. Segundo Daleck et al. (1998) a administração única
313 de estrógenos exógenos não tem efeito na incidência do tumor, entretanto quando
314 aplicados em conjunto com a progesterona, a possibilidade de desenvolvimentos torna-
315 se grande. Já o tratamento prolongado com progestinas sintéticas, segundo Fonseca &
316 Daleck (2000), associado ao aumento no número de casos de hiperplasias e neoplasmas
317 benignos de mama. Em nosso estudo não foi informado qual o tipo de contraceptivo

318 administrado nas pacientes participantes deste estudo, o que limita a discussão dos
319 dados obtidos. De toda forma, pode-se considerar pequeno o número de pacientes
320 portadoras de tumores mamários que foram submetidas ao tratamento com
321 contraceptivos, não tendo sido encontrado relação entre a presença de neoplasias
322 malignas e o uso deste tipo de fármaco (Tab. 3), o que nos leva a crer que o tratamento
323 hormonal não está associado, como um dos fatores principais, à carcinogênese mamária
324 canina.

325 Outro dado interessante foi o resultado obtido para o aspecto gestação (Tab. 3).
326 Foi observada uma maior frequência de tumores malignos em animais não gestantes: o
327 grupo não gestante apresentou 10,6 vezes mais chances ter tumor maligno quando
328 comparados com os animais que já haviam gestado. Em humanos, a gestação apresenta
329 um efeito protetor sobre o aparecimento de tumores de mama, mas em cadelas, de
330 acordo com Rutteman et al. (2001) este efeito não é observado. De acordo com Ramos
331 (2011) nunca ter parido ou parir poucas vezes pode levar ao surgimento de tipos
332 histológicos mais agressivos. Morris et al. (1998) afirma que cadelas nulíparas ou com
333 pequeno número de partos possuem uma maior predisposição ao surgimento de tumores
334 de mama quando comparadas com fêmeas que tiveram várias gestações. Entretanto,
335 outros autores afirmam que não há associação clara entre tumores de mama e paridade
336 (Ferri, 2003).

337 As alterações proliferativas que ocorrem no tecido mamário durante a gestação
338 estão associadas aos hormônios de crescimento e à progesterona. Esta, por sua vez, pode
339 apresentar um papel muito importante no desenvolvimento dos tumores mamários uma
340 vez que cria um ambiente altamente proliferativo o que estimula o crescimento dos
341 tumores ocasionados por outros fatores (Martins e Lopes, 2005). Ramos et al. (2012)
342 verificou em seu trabalho que a maioria das cadelas portadoras de neoplasias mamárias
343 eram nulíparas.

344 **CONCLUSÃO**

345 Os carcinomas e carcinosarcomas foram as neoplasias mamárias mais
346 frequentes, demonstrando a prevalência da origem epitelial. Quanto à caracterização
347 clínica, conclui-se que fatores prognósticos tradicionalmente relacionados ao
348 surgimento dos tumores mamários caninos, como uso de progestágenos e pseudociese,

349 não tiveram impacto na ocorrência dos tumores observados, enquanto outras
350 características e fatores epidemiológicos cujos dados na literatura ainda são conflitantes,
351 como gestação e alimentação, foram relacionados ou ao surgimento das neoplasias de
352 forma geral, ou mais especificamente ao surgimento das neoplasias malignas, o que
353 demonstra a diversidade do processo neoplásico e dos fatores que podem influenciá-lo.

354

355 REFERÊNCIAS

356 CASSALI, G.G.; LAVALLE, G.E.; DE NARDI, A.B. et al. Consensus for the
357 Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Braz. J. Vet. Pathol.*,
358 v.4, n.2, p. 153-180, 2011.

359 CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e
360 histopatológico dos tumores de mama em cadelas- revisão. *R. Clin. Vet.*, ano XI, n. 61,
361 p. 56- 63, 2006.

362 DALECK, C.R.; FRANCESCHINI, P.H.; ALESSI, A.C. et al. Aspectos clínico e
363 cirúrgicos do tumor mamário canino. *Cien.. Rural.*, v. 28, n.1, p. 95-100, 1998.

364 FELICIANO, M.A.R.; SILVA, A.S.; PEIXOTO, R.V.R. et al. Estudo clínico,
365 histopatológico e imunoistoquímico de neoplasias mamárias em cadelas. *Arq. Bras.*
366 *Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.5, p.1094-1100, 2012.

367 FERRI, S.T.S. Tumores mamários em fêmeas caninas e felinas: revisão de literatura. *A*
368 *Hor. Vet.*, ano 22, n. 131, p.64-67, 2003.

369 FERRO, A.G.; FORESTI, L.T.; SILVA, C.C. et al. Estudo retrospectivo de tumores
370 mamários em cães atendidos no HCV-UFPEL em 2011 e 2012. *Acta Vet. Bras.*, v. 7,
371 Supl. 1, 2013.

372 FONSECA, C.S., DALECK, C.R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência
373 hormonal e efeito da ovariectomia como terapia adjuvante. *Cienc. Rural*, v. 30,
374 n. 4, p.731-735. 2000.

375 HAMPE, J. E.; MISDORP, W. Tumors and dysplasias of the mammary gland.
376 *Bull. Wor. Hea. Org.*, v. 50, p. 111-113, 1974.

377 LANA, S.E.; RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In:
378 WITHROW, S.J. e VAIL, D.M. (Eds). *Withrow e MacEwen's Small Animal Clinical*
379 *Oncology*. 4.ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p.619 - 636.

- 380 MAGALHÃES, G.M. Imunomarcção de micrometástes de neoplasias mamárias
381 espontâneas em linfonodos de cadelas por meio do receptor CD44. Dissertação
382 (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho,
383 Jaboticabal, 2012.
- 384 MARTINS, L.R.; LOPES, M.D. Pseudociese canina. *Rev. Bras. Rep. Ani.*, Belo
385 Horizonte, v.29, p.137-41. 2005.
- 386 MIDSORP, W. Tumors of the mamary gland. In: MEUTEN, D.J. *Tumors in domestic*
387 *animals*. 4ed. Iowa: Iwoa State Press, 2002. Cap.12, p.575-606.
- 388 MONLUX, A. W.; ROSZEL, J. F.; MCUCAM, D. W.; PALMER, T. W. Classification
389 of epithelial canine ,mammary tumors in a defined population. *Vet. Pat.*, v. 14, p. 194-
390 217, 1977.
- 391 MORRIS, J.S.; DOBSON, J.M.; BOSTOCK, D.E. et al. Effect of ovariohysterctomy in
392 bitches with mammary neoplasms. *Vet. Rec.*. v.142, n.24, p.656-658, 1998.
- 393 MOULTON, J.E. (Ed.). *Tumors in domestic animals*. 3.ed. Berkeley :University of
394 California, 1990. p.672.
- 395 OLIVEIRA FILHO, J.C.; KOMMERS, G.D.; MASUDA, E.K. et al. Estudo
396 retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesq. Vet. Bras.*, v.30, n.2, p.177-
397 185, fev.2010.
- 398 OLIVEIRA, L.O., OLIVEIRA, R.T.; LORETTI, A. P. et al. Aspectos epidemiológicos
399 da neoplasia mamária canina. *Acta Sci. Vet.*, v.31, n.2, p. 105-110, 2003.
- 400 PHILIBERT, J. C.; SNYDER, P.W.; GLICKMAN, N. et al. Influence of host factors on
401 survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *J Vet Intern Med.* v., 17,
402 p.102-106, 2003.
- 403 QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos – Novas perspectivas. *Congr.*
404 *Cienc. Vet.*, p. 183-190, 2002.
- 405 RAMOS, C.S. *Associação entre fatores epidemiológicos e neoplasias mamárias em*
406 *cadelas*. 2011. 58 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de
407 Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- 408 RAMOS, R.S.; AVANZI, B.R.; VOLPATO, R. et al. Expressão gênica dos RE α , RE β , e
409 PR em tumores mamários de cadelas por meio do q-PCR. *Arq. Bras. Med.Vet. Zoot.* V.
410 64, n.6, p.1471-1477, 2012.

- 411 RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MacEWEN, E.G. Tumors of the mammary
412 gland In: WITHROW, S.J.; MacEWEN, E.G. *Small Animal Clinical Oncology*,
413 Philadelphia, p.455-77. 2001.
- 414 SANTOS, R.L.; NASCIMENTO, E.F.; EDWARDS, J.F. Sistema reprodutor feminino.
415 In: SANTOS, R.L.;ALESSI, A.C. *Patologia Veterinária*. São Paulo: ROCA, 2010. p.
416 797-854.
- 417 SCHMITT, F.C. Mama. In: BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo patologia*, Rio de
418 Janeiro, p. 538-62. 2000.
- 419 SORENMO, K.U., KRISTIANSEN, V.M., COFONE, M.A. et al. Canine mammary
420 gland tumors: a histological continuum from benign to malignant; clinical and
421 histopathological evidence. *Vet. and Comp. Oncol.*, v.7, n. 3, p.162-172. 2009.
- 422 TORÍBIO, J. M. M. L.; LIMA, A. E.; MARTINS FILHO, E. F et al. Caracterização
423 clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias
424 em cadelas de Salvador, Bahia. *Revista Ceres*, n. 59, v.4, p. 427-433, 2012,
- 425 ZUCCARI, D. A. P. C. *Contribuição ao estudo imunoistoquímico dos tumores*
426 *mamários em cadelas*. 1999. 122p. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal),
427 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista,
428 Jaboticabal, 1999.

ARTIGO 2

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico “Pesquisa Veterinária Brasileira”

Dosagens séricas hormonais e expressão gênica de receptores de estrógeno e progesterona em cadelas portadoras de neoplasias mamárias¹

Priscilla B. Araújo^{2*}; Daniela S. Pereira -Campinho²; Daniel N. A. Gonçalves³; Diogo M. F. Silva²; Fabio S. Mendonça⁴; Joaquim Evêncio-Neto⁵

ABSTRACT - Araújo, P.B.; Pereira-Campinho, D.S.; Gonçalves, D.N.A.; Silva, D.M.F.; Mendonça, F.S.; Evêncio-Neto, J. 2016. **[Measurement of serum hormones and gene expression of estrogen and progesterone in bitches with mammary neoplasms.]** Dosagens séricas hormonais e expressão gênica de RE e RP em cadelas portadoras de neoplasias mamárias. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: priscillaaraujo@live.com

Canine mammary neoplasms have been widely studied, especially as a model for breast cancer in women. The etiology of canine mammary neoplasms is controversial and involves mainly a hormonal influence. As such, the different patterns in expression of steroid hormones in mammary neoplasms can be relevant for selecting patients which can be benefitted by endocrine therapy, which has a prognostic and therapeutic value. The objective of this study was to investigate the serum concentrations of estradiol, progesterone, and prolactin, as well as the gene expression of estrogen receptors α and β and progesterone receptors in 60 bitches: 30 bitches with mammary neoplasms and 30 healthy bitches for the control group. There were higher levels of estradiol in bitches with malignant mammary neoplasms when compared with healthy bitches. Serum levels of prolactin were higher in bitches without mammary neoplasms when compared to the other group. Both malignant and benign tumors expressed RE α , RE β , and RP, and there was no difference in expression between malignant and benign tumors, or related to the other investigated prognostic factors (clinical staging, presence of ulceration and vascularization, time until presentation). Serum levels of estradiol increased significantly with the clinical staging of the disease. There was a strong negative correlation between serum levels of estradiol and tumor type, moderate positive correlation between prolactin and tumor type, and moderate negative correlation between serum levels of estradiol and prolactin. It is concluded that serum concentrations of estradiol and prolactin showed variations that reinforce their involvement with the physiology of the tumor process, also indicating a relationship with prognosis and malignancy of the neoplasm. Hormone receptors were expressed by the neoplasms, regardless of tumor type, and are not associated to the other classic prognostic factors, such as presence of ulcerations, vascularization, or clinical staging.

Index terms: breast tumor, estrogen, progesterone, prolactin.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

^{2*}Doutorandos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. E-mail: priscillaaraujo@live.com; danielacampinho@gmail.com; diogodmfs@hotmail.com

³ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. E-mail: daniel.nagon@gmail.com

⁴ Professor Adjunto do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. E-mail: mendoncafs@yahoo.com.br

⁵ Professor Titular do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. E-mail: evencioneto@pq.cnpq.br

RESUMO – As neoplasias mamárias caninas têm sido muito investigadas, principalmente por servir de modelo para o estudo do câncer de mama na mulher. A etiologia dos tumores mamários caninos é controversa e envolve principalmente a influência hormonal, assim o diferente padrão de expressão dos hormônios esteróides nas neoplasias mamárias pode ser relevante para selecionar os pacientes que podem se beneficiar da terapia endócrina, apresentando valor prognóstico e terapêutico. Objetivou-se com este trabalho investigar as concentrações séricas de estradiol, progesterona e prolactina e a expressão gênica dos receptores de estrógeno α e β e de progesterona em 30 cadelas portadoras de neoplasias mamárias. Verificaram-se maiores níveis séricos de estradiol em cadelas portadoras de neoplasias mamárias malignas quando comparadas as cadelas

do grupo controle. Os níveis séricos de prolactina foram maiores nas cadelas que não possuíam neoplasias mamárias quando comparadas aos demais grupos. Tanto os tumores malignos como os benignos expressaram RE α , RE β e RP, não havendo diferença na expressão entre tumores malignos ou benignos ou relacionada a outros fatores prognósticos investigados (estadiamento clínico, presença de ulceração e vascularização, tempo de evolução do processo). Os níveis séricos de estradiol aumentam significativamente com o estadiamento clínico da doença. Verificou-se moderada correlação negativa entre os níveis séricos de estradiol e prolactina. Conclui-se que as dosagens séricas de estradiol e prolactina apresentaram variações que reafirmam o envolvimento destes com a fisiologia do processo tumoral, indicando também relação com prognóstico e malignidade da neoplasia. Os receptores hormonais foram expressos pelas neoplasias, independente do tipo tumoral, e não estão associados aos outros fatores prognóstico clássicos, como presença de ulceração, vascularização ou estadiamento clínico.

Termos de indexação: progesterona, prolactina, estrógeno, tumor de mama, receptor.

INTRODUÇÃO

Os tumores mamários são comuns em cães, tendo sido relatada uma frequência superior a 50% em cadelas (Queiroga & Lopes 2002, Oliveira et al. 2003, Oliveira Filho et al. 2010, Feliciano et al. 2012). Dada à frequência com que surgem na rotina veterinária e importância que os cães possuem como animais de companhia, o estudo das neoplasias mamárias caninas ganha destaque na rotina veterinária (Fonseca & Daleck 2000).

Diversos fatores parecem estar ligados à etiologia das neoplasias mamárias, entre ele estão os fatores hormonais, como os hormônios esteróides (estrógeno e progesterona), prolactina (PRL), hormônio de crescimento (GH), fatores de crescimento (fator de crescimento tumoral - TGF e fator de crescimento epidermal - EGF) assim como os hormônios tireoidianos (Nogueira & Brentani 1996, Silva et al. 2004, Verstegen & Onclin 2006). Um sinal claro da dependência hormonal é a presença dos receptores hormonais no tecido mamário (Ramos et al. 2012). Assim, devido à importância que estes têm adquirido na prática clínica pelo seu valor preditivo e prognóstico, sua função nas neoplasias mamárias caninas tem sido exaustivamente estudada (Costa et al. 2002).

Os estrógenos assumem papel importante na oncogênese por serem considerados os promotores da iniciação das células mamárias cancerígenas e por aumentarem a taxa de proliferação pelo recrutamento de células não cíclicas dentro do ciclo celular (Ramos et al. 2012) e são responsáveis por estimular a atividade mitótica do epitélio mamário, o que eleva o risco de aparecimento dos tumores mamários (Petelero 1994). A expressão do receptor de estrógeno (RE) é sem dúvida o mais importante biomarcador em câncer de mama em humanos, pois ele fornece o índice de sensibilidade ao tratamento endócrino (Buitrago et al. 2011). Em cadelas, é elevada a proporção de tumores benignos da mama que apresentam um aumento de receptores de estrógeno e progesterona, ao contrário, apenas uma parte das neoplasias malignas apresenta esses receptores e em concentrações menores, pois com a progressão do tumor e aumento da malignidade ocorre redução da dependência hormonal (Jonhston 1993). Em pacientes humanos, a seleção de mulheres com RE positivo no tumor primário eleva o nível de resposta clínica para 60% (Depes et al. 2003).

A progesterona é um hormônio esteroide que tem como funções a supressão da atividade do miométrio, a estimulação do crescimento das glândulas endometriais e a promoção do desenvolvimento do tecido alveolar mamário (Martins & Lopes 2005). Provavelmente está envolvida com o aumento da produção de GH autócrino, que, por sua vez, pode ser capaz de estimular a síntese local ou sistêmica da secreção do fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-I). Adicionalmente, o efeito do IGF-I pode ser influenciado por níveis locais de estradiol (17-E2). Esses resultados sugerem que todos esses hormônios e fatores podem atuar como fatores de crescimento local estimulando o desenvolvimento e/ou manutenção dos tumores mamários caninos em um modo autócrino/parácrino (Queiroga et al. 2008).

A prolactina é um neuropeptídeo produzido pelas células lactotróficas da adenohipófise, sendo sua secreção estimulada por meio da supressão de dopamina hipotalâmica. Ela é responsável pela manutenção da atividade secretória, não desempenhando papel sobre a proliferação celular da glândula mamária, entretanto, estimula o crescimento do tumor mamário devido à sensibilização celular aos efeitos do estrógeno, promovendo um aumento no número de receptores de estrógeno (Fonseca & Daleck 2000). Apesar destes achados, a possibilidade da prolactina estimular a

atividade mitótica das células do epitélio mamário não pode ser afastada (Muldoon 1981). Com base em estudos morfológicos da glândula pituitária e em níveis hormonais no soro, foi sugerido que a hormônio do crescimento ou qualquer desequilíbrio de prolactina pode ser associada com a carcinogênese mamária no cão (Midsorp 2002).

O diferente padrão de expressão dos hormônios esteróides nas neoplasias mamárias pode ser relevante para selecionar os pacientes que podem se beneficiar da terapia endócrina e estudar protocolos terapêuticos baseados na administração de antagonistas de receptores de hormônios esteróides (Milanta et al. 2005). Dessa forma, o estudo da influência hormonal torna-se uma ferramenta para estabelecer o prognóstico e para avaliar se o tratamento hormonal pode ser mais benéfico que a terapia citotóxica. Partindo do pressuposto do envolvimento hormonal na carcinogênese mamária canina, o objetivo deste trabalho é avaliar os níveis séricos de estradiol, progesterona e prolactina, bem como a expressão gênica dos receptores de estrógeno α e β , e do receptor de progesterona em cadelas portadoras de neoplasias mamárias.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização do estudo, foram utilizadas 60 cadelas de diferentes idades e raças, sendo 30 destas cadelas portadoras de neoplasias mamárias, atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HOVET – UFRPE). Outras 30 cadelas híginas provenientes de abrigos foram utilizadas para composição do grupo controle. O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRPE, com licença de número 055/2015.

Os animais portadores de neoplasias mamárias participantes do estudo foram submetidos a exame clínico, hemograma e exames de imagem (radiografia de tórax e ultrassonografia de abdômen). Estes últimos foram indicados para investigação de metástase pulmonar e abdominal, respectivamente. Os animais portadores de metástases em órgãos torácicos ou abdominais não foram incluídos no estudo. Os tutores dos animais participantes da pesquisa responderam um questionário sobre fatores epidemiológicos que pudessem influenciar de alguma forma o processo neoplásico.

A partir dos dados coletados através da realização da anamnese, exame clínico e aplicação do questionário, os animais foram agrupados de acordo com classificação histológica da neoplasia, estadiamento clínico (Quadro 1), tempo de evolução da neoplasia, presença de ulcerações e de vascularização.

Quadro 1. Estadiamento clínico das neoplasias mamárias caninas.

Estágio	Classificação TNM
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T3 N0 M0
IV	Qualquer T N1 M0
V	Qualquer T Qualquer N M1

Adaptado de Midsorp (2002).

Após realização dos exames pré-operatórios os animais foram encaminhados para a cirurgia de mastectomia, realizando-se coleta de linfonodos e tecido mamário neoplásico para realização de exame histopatológico, que foram fixados em formol neutro tamponado a 10%. Após a fixação, os fragmentos de tumor foram conservados em álcool etílico a 70%. Em seguida, passaram pelo processo de desidratação em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina histológica líquida a 59 °C. Posteriormente os blocos foram cortados a 5 μ m em micrótomo semi-automático tipo Minot. As lâminas foram coradas pela hematoxilina-eosina e observadas em microscópio óptico biológico Trinocular NIKON 50i, acoplado a um sistema de câmera digital usado para capturar imagens microscópicas. A classificação histológica das neoplasias foi feita de acordo com Cassali et al. (2011).

Os tubos contendo as amostras de sangue foram submetidos à centrifugação, por um período de 15 minutos a 500 G. As alíquotas de soro foram acondicionadas em tubos de polietileno, tipo Eppendorf e armazenadas à temperatura de -20 °C. Fragmentos de tumor também foram armazenados em tubos tipo eppendorf e mantidos à temperatura de -80 °C para análise da expressão gênica dos receptores hormonais. Realizou-se também coleta de sangue de 30 cadelas híginas para composição do grupo controle.

Para as determinações hormonais de estradiol, progesterona e prolactina foi empregada a técnica de eletroquimioluminescência utilizando-se kits comerciais (Kit Reagente Acess Progesterona, Kit Reagente Acess Prolactina, Kit Reagente Acess Estradiol).

Para quantificação da expressão gênica dos receptores hormonais, o RNA total foi extraído de cada amostra utilizando kit RNeasy® Micro (QIAGEN®) de acordo com o protocolo do fabricante. Para eliminar a contaminação com DNA genômico, todas as amostras de RNA foram tratadas com RNA-free DNase (Promega, Madison, USA). O RNA foi quantificado pela absorbância em 260 nm e a pureza do RNA foi determinada baseada na relação de 260/280 nm por espectrofotometria (BioMate™3, Thermo®) e somente amostras com realação entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas.

Para obtenção do DNA complementar total (cDNA) foi utilizado o Kit ImProm-II(TM) Reverse Transcription System (Promega®). Foi adicionado 1 µL do primer (iniciador da reação) Oligo(dT)15 ao volume de 4 µL do RNA total (até 1µg), em seguida incubado em termobloco a 70 °C por 5 minutos e esfriado a 4 °C por 5 minutos. A essa mistura foi adicionado 4 µL do buffer Improm-II™ (5X), 2,4 µL de MgCl2 (1,5 mM), dNTP (0,5mM de cada dNTP) e 1,0 da enzima transcriptase reversa Improm-II™, totalizando um volume final de 20 µL da reação, incubada em termobloco a 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 60 minutos e inativação da enzima em 70 °C por 15 minutos.

A concentração das amostras de cDNA total foi avaliada no espectrofotômetro (BioMate™3 da Thermo®) na diluição 1:250. As amostras foram padronizadas na concentração de 100 ng/µL e estocadas em freezer - 80 °C. A expressão do mRNA para os receptores de estrógeno α e β e receptor de progesterona foi avaliada a partir da amplificação de segmentos dos genes com os oligonucleotídeos iniciadores relacionados no Quadro 2. Os iniciadores das amplificações dos genes dos receptores hormonais foram construídos utilizando o programa Primer 3 Plus (Untergasser et al. 2007) com base nas sequências nucleotídicas obtidas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD). As reações de Real-time PCR foram realizadas com o kit de amplificação Qiagen - Quantifast™ SYBR Green PCR, em termociclador (Rotor-Gene Q da Qiagen®), as reações foram realizadas em duplicadas com controle negativo para identificar reações inespecíficas.

Em cada reação foram utilizados 2,0 µL do cDNA (100ng/µL), 7,5 µL do Qiagen - Quantifast™ SYBR Green PCR, 0,5 µL de primer sense e anti-sense (10 pM) e 5,5µL de H2O Milli Q, totalizando um volume final de 15 µL. Os seguintes ciclos foram empregados: temperatura inicial de 95°C por 5 min (ativação da enzima), 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 30 segundos (captura da fluorescência). As condições do Melting foram: temperatura de 60 a 95 °C, com incremento de 0,5 °C por 5 segundos. O gene de referência utilizado para normatizar as expressões dos genes em estudo foi o β -Actin. A quantificação relativa da expressão dos genes foi calculada pelo método 2 -delta delta Ct (Livak & Schmittgen, 2001).

Quadro 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no PCR em tempo real para amplificação dos genes ER α , ER β , PR e GAPDH

Nome do oligonucleotídeo	Sequência	Tamanho
ER α	S 5'AACGCCTCTGTCTCGTCTGT3' A 5'GTA CTCAATGCTCCCCTGGA3'	110pb
ER β	S 5'TCCCAGCAGTGCCAATAACTCAGA3' A 5'TGCATACAGAAAGTGACGACTGGCA3'	120pb
PR	S 5'CAAACATGTCAGTGGGCAGATGC3' A 5'CTGCCACATGGTGAGGCATAATGA3'	110pb
GAPDH	S 5'GGAGAAAGCTGCCAAATATG3' A 5'ACCAGAAATGAGCTTGACA3'	200pb

S = "sense"; A = "antisense"; pb = pares de bases. RE α : receptor de estrógeno alfa; RE β : receptor de estrógeno beta; RP: receptores de progesterona; GAPDH = gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

Realizou-se uma análise de normalidade através dos testes de Shapiro-Wilk. A partir disso, empregou-se o teste de Tukey para comparação dos resultados das variáveis paramétricas e os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para as variáveis não-paramétricas. A correlação entre os resultados foi feita mediante o teste de Spearman (Sampaio 1998). O programa IBM SPSS Statistics 23.0 foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos e o nível de significância adotado foi de 5,0%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As neoplasias malignas foram as mais frequentes (76,7%), destacando-se o carcinossarcoma (36,7%) entre estas (Quadro 3). Os tumores benignos estiveram presentes em 23,3% dos animais, sendo o adenoma o tipo histológico mais frequente (13,3%). Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira et al. (2003), que observaram que 71,8% das cadelas participantes de seu estudo eram portadoras de neoplasias malignas. Já para Queiroga & Lopes (2002) aproximadamente 52% dos tumores mamários caninos são malignos. Frequências superiores a 70%, resultados parecidos aos que foram observados no presente trabalho foram descritos por Oliveira Filho et al. (2003) e Ramos et al. (2012).

Quadro 3. Frequência dos tipos histológicos encontrados em cadelas portadoras de neoplasias mamárias

Tipo de tumor	FA	FR%
Adenoma	4	13,3%
Adenoma complexo	2	6,7%
Carcinoma anaplásico	1	3,3%
Carcinoma complexo	2	6,7%
Carcinoma mucinoso	1	3,3%
Carcinoma sólido	3	10,0%
Carcinoma tubular	4	13,4%
Carcinossarcoma	11	36,7%
Fibroadenoma	1	3,3%
Osteossarcoma	1	3,3%
Total	30	100,0%

FA- Frequência absoluta; FR- Frequência relativa.

A maior presença de neoplasias malignas, por vezes está associada à demora na apresentação dos pacientes no hospital, pois tumores benignos podem vir a se tornar malignos (Sorenmo et al. 2009). Os tumores mistos malignos foram os tipos tumorais mais encontrados por Daleck et al. (1998) e Oliveira et al. (2003), e, de acordo com Oliveira et al. (2003), os tumores de origem epitelial são os mais frequentes entre as neoplasias mamárias. Em nossos achados a neoplasia maligna mais frequente tem origem mista, entretanto, somando-se os outros tipos tumorais observados, verificamos que os carcinomas, de forma geral, tiveram frequência semelhante a do carcinossarcoma, concordando com os relatos Daleck et al. (1998) e Oliveira et al. (2003).

A identificação do tipo histológico pode ser considerada um fator independente para determinação do prognóstico. Neste sentido, os carcinossarcomas são caracterizados por serem extremamente variáveis, com crescimento rápido, composto por células que morfológicamente lembram células epiteliais. Macroscopicamente eles são bem delineados, frequentemente com uma área de tecido ósseo que se apresenta ao corte (Cassali et al. 2011).

É importante ressaltar que o valor das classificações histológicas é baseado na capacidade de predição do comportamento biológico da neoplasia. Como existem muitas classificações morfológicas propostas, as diferenças geram divergências em levantamentos epidemiológicos e em relatos de casos (Hampe & Misdorp 1974; Monlux et al. 1977; Midsorp 2002; Cassali et al. 2011), assim, a falta de uniformização da nomenclatura utilizada dificulta a comparação dos dados epidemiológicos e medidas terapêuticas.

Verificaram-se neste trabalho maiores níveis séricos de estradiol em cadelas portadoras de neoplasias mamárias malignas quando comparadas as cadelas do grupo controle ($p=0,001$) (Quadro 4). Estes dados estão de acordo com Queiroga et al. (2008) quando verificaram que tumores malignos apresentaram maiores concentrações teciduais de estradiol e progesterona quando comparados a tumores benignos e a mamas saudáveis. Nossos resultados também reforçam os relatos de Ramos et al. (2012), que afirmam que os estrógenos são considerados os promotores da iniciação das células mamárias cancerígenas e podem aumentar a taxa de proliferação pelo recrutamento de células não cíclicas dentro do ciclo celular. Muldoon (1981) verificou que a administração de estradiol aumentou os níveis de receptores nucleares, ao contrário da atividade do receptor de progesterona, que não foi influenciada por prolactina ou estradiol. Ainda segundo este autor, os níveis de receptor de progesterona refletem a atividade dos

receptores de estrógeno. Contudo, em nosso trabalho, não foi possível verificar associação entre estradiol e seus respectivos receptores, ou entre os receptores de estrógeno e de progesterona.

Quadro 4. Comparação entre os resultados das variáveis analisadas pelo tipo de tumor.

Grupo	Estradiol ^(A)	PRL ^(A)	P4 ^(B)	RE α ^(C)	RE β ^(C)	RP ^(C)
Maligno	38,98 \pm 13,68a	0,057 \pm 0,078b	20,19	9,94	9,91	11,41
Benigno	30,75 \pm 17,55	0,037 \pm 0,012	15,00	12,75	12,88	6,88
Controle	15,56 \pm 9,38b	0,231 \pm 0,201a	17,69	-	-	-
Valor P	<0,001*	0,004*	0,623	0,437	0,385	0,178

^(A) Comparação entre médias pelo teste de Tukey; ^(B) Comparação entre os *ranks* médios pelo teste de Kruskal-Wallis; ^(C) Comparação entre os *ranks* médios pelo teste de Mann-Whitney; Letras diferentes na mesma coluna igual a diferença estatística; *Diferença significativa ao nível de 5%. PRL: prolactina, P4: progesterona, RE α : receptor de estrógeno α , RE β : receptor de estrógeno β , RP: receptor de progesterona.

Os estrógenos são considerados como um dos fatores etiológicos dos tumores mamários em cadelas por aumentar a taxa de proliferação celular, predispondo as células a sofrerem alterações neoplásicas (Fonseca & Daleck 2000). O aumento de estradiol sérico associado ao proestro pode estimular as células que expressam RE a sintetizarem receptor de progesterona (RP) (Sartin et al. 1992), entretanto em nossos resultados o aumento da concentração de estradiol não esteve ligado ao aumento de nenhum dos referidos receptores.

Os estrógenos estimulam a atividade mitótica do epitélio mamário, o que eleva o risco de aparecimento do tumor, entretanto não determina seu surgimento (Peteleiro 1994). Assim, o aumento nos níveis séricos é indicativo da influência hormonal na oncogênese, bem como pode ser considerado indicativo de pior prognóstico de acordo os resultados encontrados neste trabalho, uma vez que esteve relacionado às neoplasias malignas. O aumento dos níveis séricos de estradiol não esteve relacionado ao aumento da expressão de receptores hormonais, sejam eles receptores de estrógeno ou de progesterona.

Quanto aos níveis séricos de prolactina, observou-se que estes foram maiores nas cadelas do grupo controle, quando comparadas aos demais grupos $p=0,004$ (Quadro 4), corroborando com Queiroga et al. (2005) que também verificaram maiores concentrações séricas de prolactina nos animais do grupo controle quando comparados aos grupos portadores de neoplasias malignas e de neoplasias benignas, também não observando diferença entre estes dois últimos. Estes mesmos autores também relatam que os níveis de hormônios esteróides foram maiores no grupo das neoplasias malignas, resultado semelhante ao encontrado no nosso estudo.

A prolactina é responsável por sensibilizar o tecido aos efeitos do estrógeno, promovendo um aumento no número de receptores deste último. Trata-se um hormônio produzido pela glândula pituitária que na última década surgiu como um promissor fator prognóstico no câncer de mama em mulheres. Relatos conflitantes foram publicados sobre a elevação dos níveis de prolactina em cães portadores desse tipo de neoplasia (Fonseca & Daleck 2000).

Trabalhos relatam que as glândulas mamárias neoplásicas são capazes de sintetizar prolactina, que exerceria um efeito de feedback negativo na secreção de PRL pela glândula pituitária (Vonderhaar 1999, Goffin et al. 2002), o que justificaria os menores níveis séricos de prolactina em fêmeas portadoras de neoplasias mamárias quando comparadas ao grupo controle. Há ainda estudos que indicam que hormônios esteróides e prolactina interagem sinergicamente para controlar o crescimento neoplásico das glândulas mamárias em mulheres e roedores (Ormandy et al. 1997, Gutzman 2004).

Tanto os tumores malignos como os benignos expressaram RE α , RE β e RP, não havendo diferença na expressão entre tumores malignos ou benignos (Quadro 4). A presença dos receptores é sinal claro da dependência hormonal das neoplasias. Nos tumores malignos, a expressão dos genes que codificam os receptores dos hormônios estrógeno e progesterona pode estar diminuída, sobretudo em neoplasias de maior grau de malignidade ou nas fases mais avançadas da doença (Peteleiro 1994).

Apesar de não haver diferença estatística, é possível observar que nas neoplasias benignas houve uma maior expressão de RE do que nas neoplasias malignas, enquanto RP foi mais expresso nas neoplasias malignas. Ramos et al. (2012) afirma que houve uma maior tendência para expressão dos receptores no grupo do animais controle e uma menor expressão nos grupos dos

animais portadores de neoplasias malignas. Além disso, estes mesmos autores verificaram uma maior expressão de RE α em relação a RE β . Entretanto RE α , RE β , RP foram observados em neoplasias mamárias benignas, malignas e no grupo controle.

Na avaliação da expressão dos RE e RP, os resultados obtidos demonstraram que os dois grupos de animais, com lesões benignas ou malignas, expressaram receptores de estrógeno alfa, beta e progesterona. Animais com tumores de mama com RE e RP, ou somente RE, apresentam melhor prognóstico que aqueles que possuem somente RP, visto que a presença dos primeiros correlaciona-se com tumores bem diferenciados (Sartin et al. 1992). Assim a expressão de ambos os receptores em tipos histológicos malignos e benignos sugere um melhor prognóstico para os pacientes, por tratar-se de neoplasias melhor diferenciadas. A ausência da diferença de expressão entre tumores malignos e benignos difere do que tem sido relatado na literatura, e pode ser justificada pela presença de neoplasias menos agressivas.

Quanto às concentrações séricas de progesterona, não foram observadas variações significativas entre os grupos maligno, benigno e controle (Quadro 4). De acordo com Queiroga et al. (2005) os níveis teciduais de progesterona são em tumores malignos, quando comparados ao tumores benignos. Em cães, a progesterona é responsável por promover tumores mamários através da estimulação da produção de GH pelas células da glândula mamária.

Segundo alguns autores, a progesterona pode estar ligada ao surgimento de neoplasias benignas, pela indução de um ambiente altamente proliferativo e o efeito da interação entre a progesterona e o estrógeno pode estar diretamente ligado ao aparecimento de tumores mamários em cadelas (Martins & Lopes 2005), entretanto em nosso trabalho não foi verificada alterações nos níveis séricos de progesteronas relacionadas a quaisquer das características observadas.

Quadro 5. Comparação entre os *ranks* médios dos resultados das variáveis analisadas pelo estadiamento.

Estadiamento	Estradiol	PRL	P4	REα	REβ	RP
I	18,33	16,67	14,67	11,33	14,33	11,83
II	22,30	17,20	19,70	9,20	11,60	7,70
III	23,94	10,75	21,50	10,25	6,88	12,88
IV	33,88	11,38	17,13	12,00	13,50	8,25
Controle	10,78	24,91	17,69	-	-	-
Valor P ^(A)	0,031*	0,390	0,708	0,903	0,139	0,369

^(A) Comparação entre os *ranks* médios pelo teste de Kruskal-Wallis; *Diferença significativa ao nível de 5%. PRL: prolactina, P4: progesterona, RE α : receptor de estrógeno α , RE β : receptor de estrógeno β , RP: receptor de progesterona.

Quanto ao estadiamento clínico da doença (Quadro 5) observa-se que os níveis séricos de estradiol aumentaram significativamente, sendo observados menores níveis séricos no grupo controle ($p=0,031$). Os níveis séricos de prolactina, apesar de não observada diferença estatística, foram menores nos animais com o estadiamento clínico mais avançado. O que pode sugerir, conforme observado por Vonderhaar (1999) e Goffin et al. (2002), que as células cancerígenas dos tumores mamários em estágio mais avançado seriam capazes de sintetizar prolactina, produzindo um efeito de feedback negativo o que, por sua vez, diminuiria os níveis séricos de PRL.

O estrógeno tem importância no desenvolvimento da glândula mamária normal e influencia o crescimento e comportamento dos tumores mamários das mulheres e nas cadelas (Fonseca & Daleck 2000).

Em relação ao tempo de evolução, não foi verificada diferença ao compararmos a expressão dos receptores hormonais considerados (Quadro 6). Quando comparadas os níveis séricos das dosagens hormonais, observou-se maiores concentrações de estradiol nos animais com menor tempo de evolução da doença ($p=0,001$), e maiores níveis séricos de prolactina nos animais do grupo controle ($p=0,011$).

Sabe-se que com o avançar do tempo, as neoplasias tendem a assumir características de maior malignidade, que incluem a perda da expressão dos receptores hormonais (Ramos et al. 2012), e perda da dependência hormonal (Fonseca & Daleck 2000). Assim, espera-se observar em processos com menores períodos de evolução uma maior expressão de receptores hormonais, bem como uma maior dependência hormonal que pode ser identificada a partir da observação de

maiores níveis séricos hormonais, reforçando assim os resultados encontrados no presente trabalho.

Quadro 6. Comparação entre os *ranks* médios dos resultados das variáveis analisadas pelo tempo de evolução.

Tempo de Evolução	Estradiol	PRL	P4	RE α	RE β	RP
< 6 meses	28,67	16,33	14,33	12,00	16,17	12,67
6 a 12 meses	23,07	13,43	18,64	13,57	7,50	9,64
> 12 meses	24,60	12,45	20,95	7,90	10,90	10,45
Controle	10,78	24,91	17,69			
Valor P ^(A)	0,001*	0,011*	0,775	0,135	0,099	0,759

^(A) Comparação entre os *ranks* médios pelo teste de Kruskal-Wallis; *Diferença significativa ao nível de 5%. PRL: prolactina, P4: progesterona, RE α : receptor de estrógeno α , RE β : receptor de estógeno β , RP: receptor de progesterona.

Convém ressaltar também, que muitos proprietários relatam um grande intervalo entre a observação do tumor e a apresentação do animal ao Veterinário, que por vezes só acontece quando há ulceração ou quando o crescimento passa a acontecer de forma bastante acelerada. Mais de 50% dos proprietários relataram que esperaram mais de 1 ano para levarem suas cadelas para consulta. É sabido que o diagnóstico e o tratamento precoces proporcionam um melhor prognóstico aos pacientes (Oliveira et al. 2003).

No que se refere a presença ou ausência de ulcerações, observou-se menores concentrações séricas de estradiol no grupo controle ($p < 0,001$), que também apresentou maiores concentrações de prolactina ($p = 0,004$). Não houve diferença estatística para expressão dos receptores hormonais (Quadro 7). Queiroga et al. (2005) observou que os níveis de prolactina mais altos foram relacionados com a presença de ulceração e aderência a pele e tecidos adjacentes (Queiroga et al. 2005). Segundo Oliveira et al. (2003) a ulceração é considerada um fator de malignidade, o que indica que o resultado observado pode indicar o possível papel da PRL na determinação do prognóstico de cadelas portadoras de neoplasias mamárias, contudo, são necessárias maiores investigações no intuito de melhor determinar a importância deste achado.

Apesar de não ter sido observada diferença estatística, verificou-se uma tendência a maior de RP em animais portadores de neoplasias ulceradas. Os receptores de estrógeno estiveram mais presentes nas neoplasias não ulceradas. De acordo com Sartin et al. (1992) a diminuição da proporção entre RE e RP pode ser associada com diminuição da diferenciação celular e progressão da doença, tanto em cães, quanto em humanos.

Quadro 7. Comparação entre os *ranks* médios dos resultados das variáveis analisadas pela presença de neoplasias ulceradas.

Ulceração	Estradiol	PRL	P4	RE α	RE β	RP
Sim	24,88	16,25	23,50	9,25	8,75	12,75
Não	24,63	12,66	18,06	10,81	10,94	9,94
Controle	10,78	24,91	17,69			
Valor P ^(A)	<0,001*	0,004*	0,599	0,682	0,554	0,437

^(A) Comparação entre os *ranks* médios pelo teste de Mann-Whitney; *Diferença significativa ao nível de 5%. PRL: prolactina, P4: progesterona, RE α : receptor de estrógeno α , RE β : receptor de estógeno β , RP: receptor de progesterona.

Quanto à presença de vascularização nas neoplasias estudadas, observou-se que os maiores níveis séricos de estradiol estiveram presentes nas cadelas portadoras de neoplasias ulceradas ($p < 0,001$), enquanto os maiores níveis de prolactina foram observados nas cadelas do grupo controle ($p = 0,005$). Quanto a expressão dos receptores hormonais, não foi observada diferença estatística no quesito vascularização.

De acordo com Illera et al. (2006) os altos níveis de estradiol podem aumentar o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um fator chave para a angiogênese. Sabe-se também que a vascularização é um fator crucial para a continuidade do crescimento dos tumores, e sobrevivência das células neoplásicas (Midsorp, 2002). Como o crescimento e o risco de metástases dependem do

crescimento de novos vasos adjacentes ao tumor, a presença de vascularização nos tumores pode ser associada a um prognóstico mais reservado, que neste estudo, esteve associada também aos maiores níveis séricos de estradiol, o que permite também pensar nos altos níveis deste como um indicador de mau prognóstico associado à angiogênese.

Assim a associação de altos níveis de estradiol à característica de vascularização das neoplasias concordam com os achados de Illera et al. (2006) sugerindo que o hormônio em questão pode ser capaz de estimular fatores angiogênicos, diretamente ligados a neoplasias mais agressivas, com maior poder invasivo, e, conseqüentemente, de prognóstico desfavorável.

Quadro 8. Comparação entre os ranks médios dos resultados das variáveis analisadas pela vascularização.

Vascularização	Estradiol	PRL	P4	RE α	RE β	RP
Sim	29,20	13,00	16,40	6,80	7,80	10,10
Não	23,17	13,50	20,07	11,73	11,40	10,63
Controle	10,78	24,91	17,69			
Valor P ^(A)	<0,001*	0,005*	0,731	0,119	0,266	0,866

^(A) Comparação entre os ranks médios pelo teste de Mann-Whitney; *Diferença significativa ao nível de 5%. PRL: prolactina, P4: progesterona, RE α : receptor de estrógeno α , RE β : receptor de estrógeno β , RP: receptor de progesterona.

Os maiores níveis de estrógeno estiveram associados a neoplasias malignas, com estadimento clínico mais avançado, ulceradas e vascularizadas. Esses resultados podem indicar o papel dos estrógenos no desenvolvimento tumoral, exercendo um efeito mitogênico nas células tumorais, o que favoreceria a progressão tumoral.

Verificou-se moderada correlação negativa entre os níveis séricos de estradiol e prolactina (Quadro 9). Contrariamente, Swenson (1996) afirma que os estrogênios aumentam a secreção de prolactina. Na literatura consultada, não foram verificadas associações entre os níveis séricos de prolactina e estradiol em cadelas portadoras de neoplasias mamárias, contudo, individualmente, ambos são citados por possuírem um papel promotor da carcinogênese mamária (Fonseca & Daleck 2000, Buitrago et al. 2011, Feliciano, 2012).

Quadro 9. Análise de correlação das variáveis pelos grupos (maligno, benigno e controle) através do teste de Spearman.

Parâmetros	Estradiol	P4	PRL	RE α	RE β
Estradiol (Valor P)					
Progesterona (Valor P)	0,186 (0,278)				
PRL (Valor P)	-0,467 (0,004*)	-0,268 (0,114)			
REα (Valor P)	0,212 (0,369)	0,149 (0,531)	-0,158 (0,506)		
REβ (Valor P)	-0,143 (0,548)	0,265 (0,259)	0,040 (0,867)	-0,049 (0,838)	
RP (Valor P)	-0,173 (0,466)	-0,374 (0,104)	-0,164 (0,490)	-0,121 (0,611)	0,144 (0,544)

N – Total de amostras; *Associação significativa ao nível de 5%. PRL: prolactina, P4: progesterona, RE α : receptor de estrógeno α , RE β : receptor de estrógeno β , RP: receptor de progesterona.

De acordo com Kojima et al. (1996) o risco de desenvolvimento do câncer de mama é essencialmente determinado pela intensidade e duração da exposição do epitélio mamário à ação conjunta da prolactina e do estrógeno. Nossos resultados mostraram que quanto maior a concentração sérica de estradiol, menor os níveis de PRL, estando o estradiol associado à

características de maior malignidade, enquanto para PRL não foi verificada tal associação. Assim, são necessários mais estudos que possam esclarecer o papel da interação de estradiol e PRL na oncogênese mamária.

Na literatura também são relatadas associações entre progesterona e estradiol ou entre os hormônios esteroides e a expressão de seus respectivos receptores (Fonseca & Daleck 2000, Queiroga et al. 2005, Queiroga et al. 2008). Apesar destes resultados, em nosso trabalho não foi verificada correlação significativa, o que traz mais dúvidas a respeito do papel da regulação hormonal e da interação entre estes hormônios na carcinogênese mamária canina.

CONCLUSÕES

As dosagens séricas de estradiol e prolactina, quando relacionadas ao tipo tumoral (benigno ou maligno), ao estadiamento clínico da doença, e presença de ulceração e vascularização apresentaram variações que reafirmam o envolvimento destes com a fisiologia do processo tumoral, indicando também relação com prognóstico e malignidade da neoplasia.

Não foram verificadas diferenças entre a expressão dos receptores hormonais, o que leva a acreditar que eles podem ser expressos pelas neoplasias, independente do tipo tumoral, e não estão associados aos outros fatores prognóstico clássicos, como presença de ulceração, vascularização ou estadiamento clínico. A expressão de receptores hormonais, independente do tipo tumoral ou estadiamento clínico traz a possibilidade da utilização de tratamentos com antagonistas hormonais e fármacos anti-hormonais, que infelizmente ainda não fazem parte da rotina veterinária.

REFERÊNCIAS

- Buitrago F., Uemura G. & Sena M. C. F. 2011. Fatores prognósticos em câncer de mama. *Comunicação em Ciências da Saúde*, 22: 69-82.
- Cassali, G.G.; Lavalle, G.E.; De Nardi, A.; Ferreira, E.; Bertagnolli, A.C.; Estrela-Lima, A.; Alessi, A.C.; Daleck, C.R.; Salgado, B.S.; Fernandes, C.G.; Sobral, A.C.; Amorim, R.L.; Gamba, C.O.; Damasceno, K.A.; Auler, P.A.; Magalhães, G.M.; Silva, J.O.; Raposo, J.B.; Ferreira, A.M.R.; Oliveria, L.O; Malm, C.; Zuccari, D.A.P.C.; Tanaka, N.M.; Ribeiro, L.R.; Campos, L.C.; Souza, C.M.; Leite, J.S.; Soares, L.M.C.; Cavalcanti, M.F.; Fonteles, Z.G.C.; Schuch, I.D.; Paniago, J.; Oliveira, T.S.; Terra, E.M.; Castanheira, T.L.L.; Feliz, A.O.C.; Carvalho, G.D.; Guim, T.N.; Garrido, E.; Fernandes, S.C.; Maia, F.C.L.; Dagli, M.L.Z.; Rocha, N.S.; Fukumasu, H.; Grandi, F.; Machado, J.P.; Silva, S.M.M.S.; Bezerril, J.E.; Frehse, M.S.; Paes De Almeida, E.C. & Campos, C.B. 2011. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 4, (2): 153-180.
- Costa S.D., Lange S., Klinga K., Merkle E. & Kaufmann, M. 2002. Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer. *European Journal of Cancer*, 38 (10): 1329-1334.
- Daleck, C.R. Franceschini, P.H., Alessi, A.C., Santana, A.E., Martins, M.I.M. 1998. Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. *Ciência Rural*, 28 (1): 95-100.
- Depes, D.B.; Souza, M. A., Ribalta, J. C. L., Alves, M. T. S., Kemp, C.; Lima, G. R. 2003. Alterações na expressão do antígeno nuclear de proliferação celular e dos receptores de estrogênio e de progesterona provocadas pela quimioterapia primária no carcinoma de mama. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 25(8): 545-552.
- Feliciano, M.A.R.; Silva, A.S.; Peixoto, R.V.R.; Galera, P.D.; Vicente, W.R.R. 2012. Estudo clínico, histopatológico e imunoistoquímico de neoplasias mamárias em cadelas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64 (5): 1094-1100.
- Fonseca, C. S; Daleck, C. R. 2000. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovario-histerectomia como terapia adjuvante. *Ciência Rural*, 30: 731-735.
- Goffin, V.; Binart, N.; Touraine, P.; Kelly, P.A. 2002. Prolactin: the new biology of an old hormone, *Annual Review of Physiology*. 64:47-67.
- Gutzman, J.H.; Miller, K.K.; Schuler, L.A. 2004. Endogenous human prolactin and not exogenous human prolactin induces estrogen receptor alfa and prolactin receptor expression and increases estrogen responsiveness in breast cancer cells, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1: 69-77.

- Hampe, J. E.; Misdorp, W. 1974. Tumors and dysplasias of the mammary gland. *Bulletin of the World Health Organization*, 50: 111-113.
- Illera, J.C.; Pérez-Alenza, M.D.; Nieto, A. Jiménez, M.A., Silvan, G.; Dunner, S; Peña, L. 2006. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids*, 71:541-548.
- Johnston S. D. Reproductive systems. In: Slatter D. (Ed). *Textbook of Small Animal Surgery*. 2nd edn. Philadelphia: Saunders, p. 2177-2199, 1993.
- Kojima H., Fukazawa, Y.; Sato, T.; Enari, M.; Matsuzawa, A.; Tsunoda, S.; Nagasawa, H.; Ohta, Y.; Iguchi, T. 1996. Apoptosis of pregnancy-dependent mammary tumor and transplantable pregnancy-dependent mammary tumor in mice. *Cancer Letter*, 110: 113-121.
- Martins, L.R. & Lopes, M.D. 2005. Pseudociese canina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, 29:137-41.
- Misdorp, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. *Tumors in domestic animals*. 4ed. Iowa: Iowa State Press, 2002. Cap.12, p.575-606.
- Milanta, F.; Calandrella, M.; Bari, G. Niccolini, M., Vannozi, I., Poli, A. 2005. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science*, 79:225-232.
- Monlux, A. W.; Roszel, J. F.; Mccum, D. W.; Palmer, T. W. 1977. Classification of epithelial canine mammary tumors in a defined population. *Veterinary Pathology*, v. 14, p. 194-217.
- Muldoon, T.G. 1981. Interplay between estradiol and prolactin in the regulation of steroid hormone receptor levels, nature, and functionality in normal mouse mammary tissue. *Endocrinology*, 109 (5): 1339-1346.
- Nogueira, C.R. & Brentani, M.M. 1996. Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines. *Journal Steroid Biochemical and Molecular Biology*, 59 (3/4):271-279.
- Oliveira Filho, J.C.; Kommers, G.D.; Masuda, E.K.; Marques, B.F.M.P.P.; Figuera, R.A.; Irigoyen, L.F.; Barros, C.L.S. 2010. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30 (2): 177-185.
- Oliveira, L.O.; Oliveira, R.T.; Loretti, L.P.; Rodrigues, R.P.; Driemeier, D. 2003. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae*. 31 (2):105-110.
- Ormandy, C.J.; Hall, R.E.; Manning, D.L.; Robertson, J.F.R.; Blamey, R.W.; Kelly, P.A.; Nicholson, R.I.; Sutherland, R.L. 1997. Coexpression and cross-regulation of the prolactin receptor and sex steroid hormone receptors in breast cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(11):3692-3699.
- Peteleiro, M.C. 1994. Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, LXXXIX (509): 10-29.
- Queiroga F. & Lopes C. 2002. Tumores mamários caninos: novas perspectivas. *Anais Congresso de Ciências Veterinárias*, p.183-190.
- Queiroga, F.L., Pérez-Alenza, M.D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C., Illera, J.C. 2005. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *Journal Steroid Biochemical and Molecular Biology*, 94 (1-3):181-187.
- Queiroga, F.L.; Pérez-Alenza, M.D.; Silvan, G.; Peña, L.; Lopes, C.S.; Illera, J.C. 2008. Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17 β -estradiol) in canine mammary tumours. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 110 (1-2):76-82.
- Ramos, R.S.; Avansi, B.R.; Volpato, R.; Pignaton, W. Castan, E.P.; Costa, F.A.A.; Lopes, M.D. 2012. Expressão gênica dos RE α , RE β , e PR em tumores mamários de cadelas por meio do q-PCR. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 64 (6):1471-1477.
- Sampaio, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- Sartin, E.A., Barnes, S., Kwapien, P., Wolfe, L.G. 1992. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 38 (II):2196-2200.
- Silva, A.E.; Serakides, R.; Cassali, G.D. C. 2004. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Ciência Rural*, 34 (2):625-633.
- Sorenmo, K.U., Kristiansen, V.M., Cofone, M.A., Shofer, F.S., Breen, A.M., Langeland, M., Mongil, C.M., Grondahl, A.M., Teige, J., Goldschmidt, M.H. 2009. Canine mammary gland tumors: a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7(3):162-172.

- Swenson, M. J. Dukes: fisiologia dos animais domésticos / 11.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1996. 855 p.
- Verstegen, J.P.; Onclin, K. 2006. Prolactin and anti-prolactinic agents in the pathophysiology and treatment of mammary tumors in the dog. Proceedings of the North American Veterinary Conference, 7:7-11.
- Vonderhaar, B.K. 1999. Prolactin involvement in breast cancer, Endocrine-Relat. Cancer, 6:389-404.

ARTIGO 3 (Comunicação)

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico “Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia”

1 **Dosagem sérica do marcador tumoral Ca 15.3 em cadelas portadoras de neoplasias**
2 **mamárias pelo método de eletroquimioluminescência**

3 **Serum concentration of the tumor marker Ca 15.3 in bitches with mammary**
4 **neoplasms using the chemiluminescence method**

5 P. B. Araújo^{1*}; D. S. Pereira-Campinho¹; D. N. A. Gonçalves²; F. S. Mendonça³;
6 J. Evêncio-Neto⁴

7 ^{1*}Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade
8 Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. E-mail: priscillaaraujo@live.com.

9 ²Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da
10 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

11 ³Professor Adjunto do do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da
12 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

13 ⁴Professor Titular do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade
14 Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

15
16 **ABSTRATC:** The present objective was to analyze the serum levels of the tumor
17 marker Ca15.3 in healthy bitches and those with mammary neoplasms, correlating
18 results with tumor type, clinical staging, time until presentation, and presence of
19 ulceration and vascularization. For the study, 30 bitches of different breeds and ages
20 with mammary tumors and 30 healthy bitches for the control group were selected.
21 Histopathology was performed for identification of tumor type, and blood was collected
22 for measurement of serum concentration of the marker via the chemiluminescence
23 method using a commercial kit. A higher frequency of malignant neoplasms was
24 observed (76.7%), with a higher quantity of carcinosarcomas (36.7%). Regarding serum
25 concentration of the marker Ca15.3, there was no difference in serum values when
26 comparing the means from bitches with neoplasia and healthy bitches, nor when
27 comparing the other characteristics. The majority of results for serum concentration of
28 Ca15.3, whether in bitches with neoplasia or in healthy bitches, was zero. It is
29 concluded that the measurement of the marker Ca15.3 using the chemiluminescence
30 method and commercial kits for humans did not offer significant results that would
31 make this method or this marker a useful tool for patient monitoring and evaluation of
32 the prognosis of bitches with mammary neoplasms.

33 Key words: Cancer antigen 15.3, mammary tumors, female dogs.

34 Marcadores tumorais ou biomarcadores são substâncias que estão presentes no
35 tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos ou primariamente pelo
36 próprio tumor, ou secundariamente em pelo paciente em resposta a este primeiro. A
37 concentração dessas substâncias deve refletir a extensão do tumor, a resposta ao
38 tratamento e a progressão da doença (Jacobs e Haskell, 1991). Em humanos,
39 marcadores séricos tumorais desenvolvem um importante papel no manejo do paciente.
40 Numerosos marcadores tumorais séricos têm sido descritos para uso em câncer de
41 mama e hoje o CA15.3 é um dos mais indicados na prática clínica em humanos.
42 Contudo os estudos sobre esses marcadores para a medicina veterinária ainda são
43 escassos (Campos et al., 2012).

44 O antígeno do câncer 15.3 (CA15.3) é uma glicoproteína com alto peso
45 molecular produto do gene MUC 1, e está relacionada à adesão celular. MUC1 é
46 responsável por diversas propriedades celulares, que incluem proliferação celular,
47 adesão, apoptose e invasão. A sensibilidade deste marcador varia de acordo com a
48 massa tumoral e o estadiamento clínico da doença, apresentando níveis séricos elevados
49 em 60 a 80% das pacientes com metástases em câncer de mama. A dosagem do CA 15-
50 3 no pré-operatório para câncer de mama em mulheres, em estágio inicial, parece ter
51 uma relação positiva, pois pode orientar para uma terapia coadjuvante mais agressiva ou
52 apropriada a cada caso (Souza, 2002). Em humanos, altos níveis séricos de CA 15.3
53 estão correlacionados com o tamanho do tumor, estágio da doença e presença de
54 metástase em linfonodos (Manuali et al., 2012).

55 A concentração da maioria dos marcadores tumorais é extremamente baixa no
56 sangue, por isso o método que avalia os marcadores deve ser muito sensível (Souza,
57 2002). A vantagem da detecção através da eletroquimioluminescência em comparação
58 com os demais métodos consiste na preparação simples, na alta estabilidade dos
59 reagentes em uma grande sensibilidade do teste. Assim, o objetivo deste estudo foi
60 analisar os níveis séricos do marcador tumoral Ca15.3 em cadelas híginas e em cadelas
61 portadoras de neoplasias mamárias, relacionando os resultados ao tipo tumoral,
62 estadiamento clínico, tempo de evolução do quadro e presença de ulceração e de
63 vascularização.

64 Para realização do estudo, foram utilizadas 60 cadelas de diferentes idades e
65 raças, sendo 30 destas cadelas portadoras de neoplasias mamárias, atendidas no Hospital

66 Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HOVET – UFRPE). Outras
 67 30 cadelas hípidas provenientes de abrigos foram utilizadas para composição do grupo
 68 controle. O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais
 69 (CEUA) da UFRPE, com licença de número 055/2015.

70 Os animais portadores de neoplasias mamárias participantes do estudo foram
 71 submetidos a exame clínico, hemograma e exames de imagem (radiografia de tórax e
 72 ultrassonografia de abdômen). Estes últimos foram indicados para investigação de
 73 metástase pulmonar e abdominal, respectivamente. Os animais portadores de metástases
 74 em órgãos torácicos ou abdominais não foram incluídos no estudo. Os tutores dos
 75 animais participantes da pesquisa responderam um questionário sobre fatores
 76 epidemiológicos que pudessem influenciar de alguma forma o processo neoplásico.

77 Após realização dos exames pré-operatórios os animais foram encaminhados
 78 para a cirurgia, realizando-se coleta de linfonodos e tecido mamário neoplásico para
 79 realização de exame histopatológico, que foram fixados em formol neutro tamponado a
 80 10%. Após a fixação, os fragmentos de tumor foram conservados em álcool etílico a
 81 70%. Em seguida, foram desidratados em concentrações crescentes de álcool,
 82 diafanizados em xilol, e impregnados e incluídos em parafina histológica líquida a 59
 83 °C. Posteriormente os blocos foram cortados a 5 µm em micrótomo semi-automático
 84 tipo Minot. Os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina e observados em
 85 microscópio óptico biológico Trinocular NIKON 50i, acoplado a um sistema de câmera
 86 digital usado para capturar imagens microscópicas. A classificação histológica das
 87 neoplasias foi feita de acordo com Cassali et al. (2011).

88 A partir dos dados coletados na anamnese, exame clínico e aplicação do
 89 questionário, os animais foram agrupados de acordo com tipo tumoral, estadiamento
 90 clínico (Tab.1), tempo de evolução da neoplasia, presença de ulcerações e de
 91 vascularização.

92 **Tabela 1.** Estadiamento clínico das neoplasias mamárias caninas.

Estágio	Classificação TNM
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T3 N0 M0
IV	Qualquer T N1 M0
V	Qualquer T Qualquer N M1

93 Adaptado de Midsorp (2002).

94

95 Os tubos contendo as amostras de sangue foram submetidos à centrifugação, por
 96 um período de 15 minutos a 500 G. As alíquotas de soro foram acondicionadas em
 97 tubos de polietileno, tipo Eppendorf e armazenadas à temperatura de -20 °C.

98 Para a determinação sérica do marcador foi empregada a técnica de
 99 eletroquimioluminescência utilizando-se kit comercial (Kit de reagentes Access BR
 100 Monitor). Realizou-se uma análise de normalidade através dos testes de Shapiro-Wilk.
 101 A partir disso, empregou-se os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para as
 102 variáveis não paramétricas. O programa IBM SPSS Statistics 23.0 foi utilizado para a
 103 execução dos cálculos estatísticos e o nível de significância adotado foi de 5,0%.

104 Observou-se uma maior frequência de neoplasias malignas (76,7%), destacando-
 105 se entre elas o carcinossarcoma (36,7%) (Tab.1). Oliveira et al. (2003), observaram que
 106 71,8% das cadelas participantes de seu estudo eram portadoras de neoplasias malignas.
 107 Este resultado é semelhante ao encontrado no presente trabalho. Já para Queiroga e
 108 Lopes (2002) aproximadamente 52% dos tumores mamários caninos são malignos.
 109 Outros trabalhos recentes também vêm relatando frequências superiores, semelhantes às
 110 aqui encontradas (Oliveira Filho et al., 2010; Ramos et al., 2012). Entre as variáveis que
 111 podem determinar o prognóstico, o tipo tumoral pode ser identificado como um
 112 importante fator independente.

113 **Tabela 2.** Frequência dos tumores

Tipo de tumor	FA	FR%
Adenoma	1	3,3%
Adenoma complexo	2	6,7%
Adenoma Simples	3	10,0%
Carcinoma anaplásico	1	3,3%
Carcinoma complexo	2	6,7%
Carcinoma mucinoso	1	3,3%
Carcinoma sólido	3	10,0%
Carcinoma tubular	4	13,4%
Carcinossarcoma	11	36,7%
Fibroadenoma	1	3,3%
Osteossarcoma	1	3,3%
Total	30	100,0%

114 FA- Frequência absoluta; FR- Frequência relativa.

115 Quanto às dosagens séricas do marcador Ca15.3 não foi encontrada diferença
 116 estatística entre os valores séricos quando comparadas as médias de cadelas portadoras
 117 de neoplasias e de cadelas hígdas, ou tampouco quando comparados os demais grupos
 118 entre si (estadiamento clínico, tempo de evolução, e presença de ulceração e
 119 vascularização), como pode ser observado nas Tab. 3, 4, 5, 6 2 7.

120 **Tabela 3.** Comparação entre os resultados das variáveis analisadas pelo tipo de tumor.

Grupo	Ca15^(a) (U/mL)
Maligno	19,75
Benigno	17,50
Controle	17,50
<i>Valor P</i> ^(A)	0,276

121 ^(a) Comparação entre os *ranks* médios pelo teste de Kruskal-Wallis; ^{*}Diferença significativa ao nível de 5%.

122 **Tabela 4.** Comparação entre os *ranks* médios dos resultados das variáveis analisadas pelo estadiamento.

Estadiamento	Ca15 (U/mL)
I	23,50
II	17,50
III	17,50
IV	22,00
Controle	17,50
<i>Valor P</i> ^(A)	0,068

123 ^(A) Comparação entre os *ranks* médios pelo teste de Kruskal-Wallis; ^{*}Diferença significativa ao nível de 5%.

124 **Tabela 5.** Comparação entre os *ranks* médios dos resultados das variáveis analisadas pelo tempo de evolução.

Tempo de Evolução	Ca15.3 (U/mL)
< 6 meses	17,50
6 a 12 meses	20,07
> 12 meses	19,30
Controle	17,50
<i>Valor P</i> ^(A)	0,486

125 ^(A) Comparação entre os *ranks* médios pelo teste de Kruskal-Wallis; ^{*}Diferença significativa ao nível de 5%.

126 **Tabela 6.** Comparação entre os *ranks* médios dos resultados das variáveis analisadas pela presença de úlceras.

Ulceração	Ca15.3(U/mL)
Sim	22,00
Não	18,63
Controle	17,50
<i>Valor P</i> ^(A)	0,155

127 ^(A) Comparação entre os *ranks* médios pelo teste de Mann-Whitney; ^{*}Diferença significativa ao nível de 5%.

128 **Tabela 7.** Comparação entre os *ranks* médios dos resultados das variáveis analisadas pela vascularização.

Vascularização	Ca15(U/mL)
Sim	17,50
Não	19,90
Controle	17,50
<i>Valor P</i> ^(A)	0,237

129 ^(A) Comparação entre os *ranks* médios pelo teste de Mann-Whitney; ^{*}Diferença significativa ao nível de 5%.

130

131 A maioria dos resultados encontrados para dosagem sérica de Ca15.3, seja para
 132 cadelas portadoras de neoplasias, seja para cadelas hígdas foi equivalente a zero. De
 133 acordo com Jacobs e Haskell (1991), mesmo quando não é possível realizar a dosagem
 134 do marcador, a presença de metástases não pode ser descartada. Convém lembrar

135 também que o limiar de detecção do kit utilizado é 0,5 U/mL. Uma das possíveis
136 hipóteses para tal resultado pode ser devido aos níveis dos marcadores estarem abaixo
137 do limiar de detecção do kit utilizado. Resultado semelhante foi observado por Jardini
138 (2003) que, utilizando-se do método de quimioluminescência, não conseguiu realizar a
139 dosagem sérica do marcador Ca15.3 em cadelas híginas e portadoras de neoplasias
140 mamárias, atribuindo a falha a não produção da proteína pelos tipos histológicos
141 estudados, ou a produção sem liberação da proteína na circulação, ou ainda a existência
142 de diferenças estruturais que inviabilizem a utilização do kit para humanos.

143 Entretanto, tal argumento pode ser contestado pelos resultados encontrados por
144 outros autores. Manuali et al. (2012) verificou expressão tecidual de Ca 15.3 em 68%
145 das cadelas portadoras de neoplasias malignas, correlacionado positivamente este
146 achado com o grau histológico de malignidade.

147 Já Bicalho (2012) somente conseguiu realizar a dosagem de Ca15.3 em cadelas
148 híginas a partir do método de quimioluminescência após a realização de um processo de
149 concentração de proteínas no soro das cadelas avaliadas, atribuindo a falha também ao
150 limiar de detecção do kit utilizado. Após o processo de concentração foi possível
151 detectar o marcador no soro, concluindo-se que é viável a utilização do kit para
152 detecção do marcador em cadelas.

153 De acordo com Marchesi et al. (2010) a quimioluminescência é uma técnica
154 sensível, de fácil execução e baixo custo, o que torna o kit de reagentes desenvolvido
155 para humanos viável para utilização em cães. Contudo, nossos resultados mostram que
156 não foi possível realizar a dosagem do marcador utilizando-se da referida técnica,
157 provavelmente devido aos níveis séricos do marcador estarem abaixo do limiar de
158 detecção do kit, assim como observado por Bicalho (2012).

159 Campos et al. (2012) utilizando o teste ELISA, observaram em seu estudo, ao
160 comparar cadelas híginas e cadelas com e sem metástase a distância portadoras de
161 neoplasias mamárias, que as concentrações séricas de Ca15.3 foram mais elevadas
162 conforme o estadiamento clínico da doença. Resultado semelhante foi observado por
163 Gelaleti (2011), que, utilizando o teste ELISA, verificou que altos níveis séricos do CA
164 15-3 tiveram relação com a rápida evolução tumoral e menor sobrevida das cadelas,
165 inferindo seu possível uso como marcador de pior prognóstico também na espécie
166 canina.

167 Apesar da possibilidade de uso do marcador Ca15.3 ainda não se tem
168 estabelecido em Medicina Veterinária valores normais séricos, e os estudos para
169 avaliação do prognóstico e acompanhamento de cadelas portadoras de neoplasias
170 mamárias ainda são inconsistentes, sendo necessário uma melhor padronização da
171 técnica bem como melhor investigação do significado clínico da detecção do marcador
172 em cães.

173 Conclui-se que a dosagem do marcador Ca15.3 através do método de
174 eletroquimioluminescência utilizando-se kits comerciais formulados para dosagens
175 humanos não ofereceu resultados significativos que tornassem possível a utilização do
176 método ou do marcador como ferramenta para acompanhamento e avaliação do
177 prognóstico de cadelas portadoras de neoplasias mamárias. Contudo, dosagens de testes
178 séricos são procedimentos pouco invasivos, relativamente práticos, financeiramente
179 viáveis e possibilita o acompanhamento da paciente com a realização de coletas
180 periódicas, o que torna esse tipo de estudo bastante promissor.

181 REFERÊNCIAS

- 182 BICALHO, S.R. *Quantificação sérica do marcador tumoral CA15.3 em cadelas hípidas*
183 *por quimioluminescência*. 28f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
184 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2012.
- 185 CAMPOS, L.C.; LAVALLE, G.E.; ESTRELA-LIMA, A. et al. CA 15.3, CEA, and LH
186 in dogs with malignant mammary tumors. *J. Vet. Int. Med.*, v.26, p.1383-1388, 2012.
- 187 GELALETI, G.B. *Avaliação da interleucinas 8 e 12, do CA 15-3 e DNA livre circulante*
188 *como marcadores prognósticos no soro sanguíneo de cadelas com neoplasia mamária*.
189 Dissertação (Mestrado em Genética). 2011. 100f. Universidade Estadual Paulista Júlio
190 de Mesquita Filho: São Paulo.
- 191 JACOBS, E.L.; HASKELL, C.M. Clinical use of tumor markers in oncology. *Cur.*
192 *Prob. Can.*, v. 15, n.6, p.299-360, 1991.
- 193 JARDINI, F.H.M. *Avaliação dos marcadores CEA e CA15-3 no soro e CEA no tumor e*
194 *linfonodos excisados de cadelas portadoras de neoplasias mamárias*. 2003. 41f.

- 195 Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
196 Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 197 MANUALI, E.; GIUSEPPE, A.; FELIZIANI, F. et al. CA 15-3 cell lines and tissue
198 expression in canine mammary cancer and the correlation between serum levels and
199 tumour histological grade. *BMC Vet. Res.*, v.8, n.86, p. 246-261, 2012.
- 200 MARCHESI, M. C.; MANUALI, E.; PACIFICO, E. et al. Cancer antigen 15/3: possible
201 diagnostic use in veterinary clinical oncology. Preliminary study. *Vet. Res. Com.*,
202 Dordrecht, v. 34, n. 1, p. S103-S106, 2010.
- 203 MIDSORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. *Tumors in domestic*
204 *animals*. 4ed. Iowa: Iowa State Press, 2002. Cap.12, p.575-606.
- 205 OLIVEIRA FILHO, J.C.; KOMMERS, G.D.; MASUDA, E.K. et al. Estudo
206 retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 30, n.2, p.177-
207 185, 2010.
- 208 RAMOS, R.S.; AVANSI, B.R.; VOLPATO, R. et al. Expressão gênica dos RE α , RE β , e
209 PR em tumores mamários de cadelas por meio do q-PCR. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*,
210 v. 64, n.6, p.1471-1477, 2012.
- 211 SOUZA, J. V. Marcadores mucinosos associados ao câncer. *Rev. Assoc. Méd. Rio Gra.*
212 *Sul*, Porto Alegre, v. 46, n. 1-2, p. 70-83, 2002.

FICHA CLÍNICA

Nº da Ficha:		DATA:	
Nome do animal:		Idade:	
Espécie:	Raça:	Peso:	
Tutor:			
Endereço:			
CEP:		Fone:	
E-mail:			

1. Histórico:
2. Histórico familiar de tumor mamário:
3. Sinais e sintomas:

4. Alimentação:	Ração ()	Caseira ()
	Ração + caseira ()	

5. Último cio:	_____	Intervalo entre os cios:	
6. Nº de gestações:			
7. Mastite:			
8. Pseudogestações:	Sim ()	Não ()	Qtas?
9. Uso de anticoncepcional:	Sim ()		Não ()
	Qtas vezes:	Qual (is):	

10. Já fez mastectomia:	Sim ()	Não ()	Quais gls mamárias foram removidas:
11. Fez OSH:	Sim ()	Não ()	Há qto tempo:
12. Exames laboratoriais:	Hemograma	Bioquímica	Glicose
13. Citologia (prescrição do Meloxicam):			

14. Características do nódulo tumoral:

Peso: _____

Tamanho: _____

Comprimento: _____

Espessura: _____

Mobilidade: Sim () Não ()

Ulceração: Sim () Não ()

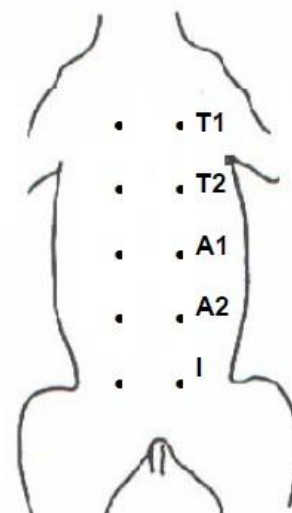
Dor local: Sim () Não ()

Infecção: Sim () Não ()

Aderência da pele: Sim () Não ()

Envolvimento de fáscia: Sim () Não ()

Envolvimento do músculo: Sim () Não ()



15. Acomentimento de linfonodo(s): Sim () Não ()

Quais:

16. Exames complementares:

17. Exames radiográficos:

18. USG:

19. Tratamentos prescritos:

20. Retornos:

 Nome e assinatura do pesquisador/colaborador