

LILIANE CUNHA CAMPOS

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES TUMORAIS SÉRICOS EM
CADELAS COM E SEM METÁSTASE
EM CÂNCER DE MAMA**

Belo Horizonte
Dezembro de 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG
FACULDADE DE MEDICINA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DE MARCADORES TUMORAIS SÉRICOS EM
CADELAS COM E SEM METÁSTASE
EM CÂNCER DE MAMA

Belo Horizonte

Dezembro de 2010

LILIANE CUNHA CAMPOS

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES TUMORAIS SÉRICOS EM
CADELAS COM E SEM METÁSTASE
EM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de
Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do
grau de Mestre em Patologia.

Área de Concentração: Patologia Geral

Orientador: Prof. Geovanni Dantas Cassali

Belo Horizonte

2010



**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
cpqg.medicina.ufmg.br



TFP OK

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LILIANE CUNHA CAMPOS, nº de registro 2009658749. Às quatorze horas do dia 20 de dezembro de dois mil e dez, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "AVALIAÇÃO DE MARCADORES TUMORAIS SÉRICOS EM CADELAS COM E SEM METÁSTASE DE CÂNCER DE MAMA", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Giovanni Dantas Cassali, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Giovanni Dantas Cassali/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprova</u>
Profa. Gleidice Eunice Lavalle	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprova</u>
Prof. Enio Ferreira	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprova</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada Aprova.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.
Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2010.

Prof. Giovanni Dantas Cassali/ Orientador _____

Profa. Gleidice Eunice Lavalle _____

Prof. Enio Ferreira _____

Prof. Wagner Luiz Tafuri (Coordenador) _____

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Wagner Luiz Tafuri
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Patologia - Faculdade de Medicina/UFMG



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral-ICB/UFMG, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

DEDICATÓRIA

Para as verdadeiras riquezas da minha vida:
meu pai José Carlos, minha mãe Solange, Leandro,
Luciano e Romeu.

A duas pessoas especiais que partiram este ano
deixando uma enorme saudade:
Minha querida avó Celeida e meu sogrão Romeu
Mata. Tenho certeza que vocês estão na torcida por
mim!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar certa de Sua presença diária em minha vida.

Aos meus pais, pelo apoio, amor, amizade e incentivo em todos os momentos.

Aos meus irmãos, meus grandes e eternos amigos.

Ao meu noivo Romeu, pelo companheirismo, carinho, paciência, amizade e por tudo mais que o faz meu príncipe.

Ao professor Geovanni, pela oportunidade, confiança e que, além de mestre se tornou um grande amigo! Valeu “prof”.

Aos amigos Luana e Fabrício e a turma do Laboratório de Patologia Comparada: Cris, Karine, Conrado, Paty, Cecília, Thamara, Marina, Lulu, Juju, Juninho, Joyce Wanessa e Érika que contribuem para que todos os dias sejam especiais!!!

À Gleidice e suas pacientes, que possibilitaram a realização deste trabalho, e que me fizeram conhecer melhor e admirar a Medicina Veterinária.

Ao Enio e Angel, pessoas que admiro muito e que sempre pude contar quando precisei.

Ao Álvaro, por me auxiliar com seus conhecimentos em oncologia.

À Mariana, pela disposição em me ajudar nas coletas de material.

À Joyce, pela parceria, amizade e boa vontade nas caminhadas até a veterinária...valeu a pena “filhotinha”!

Às minhas cunhadas e concunhados, que são pessoas maravilhosas que tenho a sorte de ter ao meu lado.

À minha sogrona Heloísa, pelo carinho, afeto e incentivo a todo o momento.

À Débora, por quem tenho um carinho enorme, me ajudou muito neste trabalho, e foi um pouquinho técnica, psicóloga, conselheira... enfim, uma verdadeira amiga!

Ao pessoal do Laboratório de Análises Clínicas Francis, em especial ao Luciano, que me abriu as portas do seu laboratório possibilitando a realização deste projeto.

À Alessandra e Lorena, que mesmo longe não mediram esforços para contribuir com meu trabalho. Vocês são 10!!!!

Aos meus amigos, que estão sempre ao meu lado, mesmo distantes, e assim fazem toda a diferença!

Muito Obrigada!

“Eu quase nada sei,
Mas desconfio de muita coisa.”

Guimarães Rosa

SUMÁRIO

	Pag.
LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS	xi
LISTA DE APÊNDICES	xi
LISTA DE ANEXOS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. Neoplasia mamária na cadela	16
2.2. Aspectos semelhantes entre neoplasias mamárias nas espécies humana e canina.....	18
2.3. Marcadores tumorais	20
2.3.1. CA15.3	24
2.3.2. CEA	25
2.3.3. Fosfatase alcalina	26
2.3.4. LDH	27
2.4. Estado nutricional	28
2.4.1. Proteínas totais	29
2.4.2. Albumina	30
3. HIPÓTESE	30

4. OBJETIVOS	31
4.1. Objetivo geral	31
4.2. Objetivos específicos	31
5. MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1. Aspectos éticos.....	32
5.2. Seleção dos casos	32
5.3. Coleta do material	33
5.4. Testes laboratoriais	33
5.4.1. CA15.3	34
5.4.2. CEA	36
5.4.3. Fosfatase alcalina	38
5.4.4. LDH	38
5.4.5. Proteínas totais	39
5.4.6. Albumina	39
5.5 Análise estatística	40
6. RESULTADOS	40
7. DISCUSSÃO	44
8. CONCLUSÃO	47
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	48
10. REFERÊNCIAS	49
11. APÊNDICE	58
12. ANEXOS.....	79

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

	Pag.
Tabela 1: Marcadores tumorais com suas respectivas utilidades clinicas	23
Tabela 2: Frequência dos tipos histológicos dos tumores mamários nas cadelas em estudo	41
Tabela 3: Média e desvio padrão das dosagens séricas de fosfatase alcalina e LDH nas cadelas dos grupos I, II, III e IV	42
Tabela 4: Média e desvio padrão das dosagens séricas de CEA e CA15.3 nas cadelas dos grupos I, II, III e IV	42
Tabela 5: Média e desvio das dosagens séricas de proteínas totais e albumina nas cadelas dos grupos I, II, III e IV	43
Gráfico 1: Correlação entre as concentrações séricas de CEA e CA15.3 e o estadiamento do câncer nas cadelas dos grupos I, II, III e IV	43

LISTA DE APÊNDICES

	Pag.
Apêndice 1: Artigo completo submetido à publicação	58
Apêndice 2: Produção científica relacionada à dissertação	77
Apêndice 3: Produção científica não relacionada à dissertação	78

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
Anexo 1: Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA UFMG	79
Anexo 2: Aprovação de artigo para publicação	80
Anexo 3: Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas de mama da cadela (Owen,1980)	81

LISTA DE ABREVIATURAS

TPS- Tissue polypeptide specific antigen

TPA- Tissue polypeptide antigen

CEA- Antígeno carcinoembrionário

CA15.3- Antígeno do câncer 15.3

EGTM- European Group Tumor Marker

LDH- Desidrogenase láctica

ASCO- American Society Clinical Oncology

Kd- kilodalton

ng- Nanograma

mL- Mililitro

Ac- Anticorpo

IBCSG- Intitute Breast Cancer Study Group

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

TNM- T= tumor; N= número de linfonodos acometido pela neoplasia; M= ocorrência de metástase à distância.

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFBA- Universidade Federal da Bahia

Nm- nanômetro

M- molar

HCl: ácido clorídrico

µL: microlitros

g/dL: Gramas por decilitro

U/L: Unidades por litro

SRD: Sem raça definida

RESUMO

Marcadores tumorais são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente por ele ou, secundariamente pelo paciente, em resposta à presença do tumor. Em medicina os marcadores CEA e CA15.3 e as enzimas LDH e fosfatase alcalina auxiliam no prognóstico e detecção de recidivas em mulheres com câncer de mama, enquanto as dosagens de proteínas totais e albumina auxiliam na avaliação do estado nutricional da paciente. Em medicina veterinária esses marcadores são pouco estudados. O objetivo deste trabalho foi determinar e avaliar as concentrações séricas de CEA, CA15.3, fosfatase alcalina e LDH em cadelas híidas e cadelas com câncer de mama com e sem metástase, verificar a existência de correlação entre os testes CEA e CA15.3 e determinar o perfil proteico dessas pacientes realizando dosagens séricas de proteínas totais e albumina. Foram avaliadas 69 cadelas sendo 10 híidas, 41 com câncer de mama sem metástase, nove com câncer de mama e metástase regional e nove com câncer de mama e metástase à distância. As concentrações séricas de CEA, LDH e fosfatase alcalina não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) entre os grupos. Entretanto, o grupo de cadelas com câncer de mama e metástase à distância apresentou aumento significativo ($p = 0,029$) de CA15.3 sérico quando comparado com os demais grupos, sugerindo associação deste marcador tumoral com o estadiamento clínico do câncer de mama na cadela. O marcador CA15.3 apresentou baixa correlação com CEA, sugerindo uma maior sensibilidade frente a evolução tumoral. Na avaliação do perfil proteico, somente a albumina apresentou-se elevada, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) no grupo de cadelas com câncer de mama sem metástase.

Palavra chave: câncer, mama, cadela, marcador tumoral, perfil proteico

ABSTRACT

Tumor markers are substances present in the tumor, blood or other fluids produced by it primarily or secondarily by the patient, in response to the presence of tumor. In medicine, serum biomarkers CEA, CA15.3 and enzymes LDH and alkaline phosphatase assist in prognosis, therapy monitoring and detection of breast cancer recurrence in women, while the levels of total protein and albumin help assess the nutritional status of the patient. In veterinary medicine, these biomarkers are rarely studied. The aim of this study was to determine and evaluate the serum concentrations of CEA, CA15.3, alkaline phosphatase and LDH in healthy female dogs and female dogs with breast cancer with and without metastases, and observe the correlation between tests CEA and CA15.3 and the disease staging, and to determine the protein profile of these patients by dosage serum total protein and albumin. We evaluated 69 dogs and 10 healthy, 41 with mammary cancer without metastases, nine with mammary cancer and regional metastasis and nine with mammary cancer and distant metastasis. Serum concentrations of CEA, LDH and alkaline phosphatase showed no significant differences ($p > 0.05$) between groups. However, the biomarker CA15.3 in the group of female dogs with mammary cancer and distant metastasis increased significantly ($p = 0.029$) compared with other groups, suggesting an association of this tumor marker with clinical staging of breast cancer in female dogs. The marker CA15.3 showed low correlation with CEA, suggesting a greater sensitivity to tumor evolution. In assessing the protein profile, only to albumin showed significant difference ($p < 0.05$) in group of female dogs with cancer without metastasis.

Keyword: cancer, mamary, female dog, tumor marker, protein profile

1- INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, têm se verificado um aumento considerável da prevalência do câncer em cães, que é considerado por alguns autores como a maior causa de morte nessa espécie (LAS MULAS & REYMUNDO, 2000; SORENMO *et al*, 2009). Estima-se que 48% das cadelas morrem ou são submetidas à eutanásia um ano após a intervenção cirúrgica para tratamento do câncer de mama, devido à recorrência tumoral ou aparecimento de metástases (GRAHAM & MYERS, 1999).

Os principais órgãos acometidos pela disseminação tumoral são: linfonodos regionais (inguinais superficiais e axilares), pulmão, e com menor frequência, rim, fígado, baço, pele, glândulas adrenais, encéfalo, olhos e esqueleto (PELETEIRO, 1994; PEREZ ALENZA *et al.*, 2000). A disseminação dos carcinomas primários da mama ocorre preferencialmente por via linfática em cadelas (PATSIKAS & DESSIRIS, 1996).

Nesse contexto tornam-se imprescindíveis estudos que investiguem a possibilidade de haver um marcador tumoral que se expresse em resposta à presença do tumor. Tais investigações 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.

Até o momento, não existem reagentes para imunoensaios específicos para câncer de mama em cadela. No intuito de avaliar a expressão de marcadores tumorais séricos frente a tumores mamários caninos, o presente estudo realizou dosagens séricas de CA15.3 e CEA, utilizados em medicina humana, e testes enzimáticos LDH e fosfatase alcalina em cadelas com neoplasias mamárias em diferente estádios.

O estado nutricional também 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. A avaliação nutricional é o primeiro passo para a identificação da desnutrição e é usualmente feita

pela combinação de parâmetros clínicos, antropométricos e laboratoriais (INUI, 1999) como avaliação do perfil protéico. Neste contexto, realizou-se também no presente trabalho, dosagens de proteínas totais e albumina sérica para avaliação do estado nutricional das pacientes submetidas à exérese tumoral.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Neoplasia mamária na cadela

Os tumores espontâneos da glândula mamária correspondem ao tipo de neoplasia mais freqüente em cadelas (PELETEIRO, 1994; CASSALI, 2000; MISDORP, 2002; CAVALCANTI & CASSALI, 2006). Essas lesões têm despertado grande interesse a pesquisadores, devido ao elevado índice de tumores malignos, em grande parte, reflexo do diagnóstico tardio, que compromete o tratamento e reduz a taxa de sobrevivência dos animais (SILVA *et al*, 2004; CAVALCANTI & CASSALI, 2006).

A etiologia do câncer de mama é multifatorial, com participação de fatores genéticos, ambientais e principalmente hormonais (SILVA *et al*, 2004). O estilo de vida aumenta a exposição da população a fatores ambientais, nutricionais e químicos potencialmente carcinogênicos, e a interferência do homem nos hábitos alimentares dos animais e no seu ambiente também os coloca sob os mesmos riscos (MOULTON, 1990; SILVA *et al*, 2004).

O aparecimento do câncer de mama em cadelas aumenta significativamente com a idade. Observa-se maior susceptibilidade entre os seis e os doze anos de idade (PELETEIRO, 1994; CASSALI, 2000), com rara ocorrência em animais com idade inferior a dois anos (MOULTON, 1990). Quanto à predisposição racial aparentemente não há uma raça específica (PELETEIRO, 1994; CASSALI *et al*, 2003).

De maneira similar à espécie humana, as neoplasias mamárias ocorrem quase que exclusivamente

em fêmeas, sendo raras em machos, acometendo menos de 1% desses animais (MIALOT, 1988). Os tumores mamários apresentam-se frequentemente como nódulos únicos ou múltiplos, podendo ocorrer diferentes tipos histológicos em uma ou mais glândulas mamárias de forma sincrônica. Na ocorrência de tumores multicêntricos aquele de pior prognóstico determinará a evolução clínica (CAVALCANTI & CASSALI, 2006).

A frequência de tumores mamários benignos e malignos em cães varia consideravelmente devido à existência de diferentes métodos de classificação dos tumores e ausência de critérios uniformes para diferenciar os tipos tumorais (CASSALI, 2000). A proporção entre tumores mamários benignos e malignos na maioria dos estudos oscila em 3:7 ou 4:6 (MISDORP *et al*, 1999).

Os tumores benignos apresentam-se geralmente como nódulos únicos ou múltiplos, bem circunscritos e firmes à apalpação. Das cadelas com tumores mamários diagnosticados como benignos, cerca de 26% desenvolvem mais tarde, tumores em outras glândulas mamárias (FAUSTINO *et al*, 2002; MISDORP, 2002). Os tumores malignos apresentam na maioria dos casos tamanhos superiores a 5 centímetros, com aderências a planos profundos, podendo apresentar por vezes, ulceração cutânea e metástases (QUEIROGA & LOPES, 2002; FERREIRA *et al.*, 2009).

O diagnóstico inicial de neoplasia mamária é realizado considerando-se a idade, o histórico reprodutivo, sinais clínicos como presença de massa mamária e aumento de volume de linfonodos regionais. Alguns sinais sistêmicos como dispnéia, tosse e claudicações também podem ocorrer devido à presença de metástases desses tumores (JONHNSTON, 1993). Essas metástases podem ocorrer por via linfática ou venosa (QUEIROGA & LOPES, 2002), acometendo principalmente linfonodos regionais, pulmões e menos frequentemente fígado, útero, vesícula urinária ou ossos (NOWAK *et al*, 2007).

O diagnóstico definitivo do tumor baseia-se no resultado histopatológico da biópsia, pois fornece informações importantes sobre a natureza, o tipo histológico e a infiltração microscópica das células tumorais, inclusive para cadeia linfática (PELETEIRO, 1994; QUEIROGA & LOPES,

2002; CASSALI, 2003). A radiografia de tórax é um procedimento rotineiro na veterinária como auxílio no diagnóstico e a ultrassonografia abdominal é realizada quando há suspeita de possíveis metástases à distância (CAVALCANTI & CASSALI, 2006).

Determinar o prognóstico de um paciente canino com neoplasia mamária pode ser difícil, uma vez que o comportamento biológico destes tumores varia consideravelmente. Desta forma, a definição de subpopulações de cadelas com evoluções distintas de sobrevida facilitaria não apenas a determinação do prognóstico, como também a decisão de melhores condutas terapêuticas (KURZMAN & GILBERTSON, 1986).

O estadiamento, que é um parâmetro crucial para a definição da abordagem clínica dos tumores malignos, envolve os seguintes parâmetros: tamanho do tumor, acometimento dos linfonodos regionais e presença de metástase à distância (OWEN, 1980; PHILIBERT *et al*, 2003). Assim pode-se dividir os casos em grupos por grau aparente da extensão da doença através do sistema TNM (tumor/linfonodo/metástase), proposto pela Organização Mundial de Saúde e aplicado apenas para carcinomas (OWEN, 1980).

Em alguns casos a exérese cirúrgica é o tratamento mais indicado (QUEIROGA & LOPES, 2002, GOMES *et al*, 2006; STRAW, 2005), sendo que, o tipo de cirurgia depende da extensão da doença, tamanho da lesão, localização e drenagem linfática (LAVALLE, 2009).

A quimioterapia é um método de tratamento adjuvante à cirurgia, para controle da doença, embora ainda não tenha sido comprovada sua eficácia em relação à taxa de sobrevida e qualidade de vida das pacientes (BERGMAN, 2007; KIRPENSTEIJN & RUTTEMAN, 2006). Métodos alternativos como radioterapia e hormonioterapia ainda são pouco utilizados na medicina veterinária (NOVOSAD, 2003).

A biopatologia dos tumores mamários caninos interessa à comunidade científica em geral pelo fato destes tumores terem sido propostos como modelo comparativo para o estudo do câncer de mama na mulher (CASSALI, 2000; QUEIROGA e LOPES, 2002; KHANNA, 2006). Do ponto

de vista acadêmico o cão serve também como modelo humano para descoberta de novas drogas e desenvolvimento de pesquisas (KHANNA, 2006), pois, quando comparado a modelos experimentais de pequenos animais de laboratório, esses tumores na espécie canina possuem maior semelhança à espécie humana (CASSALI, 2000).

2.2- Aspectos semelhantes entre neoplasias mamárias na espécie humana e canina

O tumor de mama é a neoplasia mais freqüente nas fêmeas, principalmente em mulheres e cadelas (SILVA *et al*, 2004). Em mulheres é o primeiro tipo mais frequente no mundo, respondendo por 22% dos casos novos a cada ano. Em cadelas, representam 52% de todas as neoplasias, sendo que 50% são diagnosticadas malignas (DALECK *et al*, 1998; CASSALI *et al*, 2003; OLIVEIRA *et al*, 2009).

Os tumores mamários espontâneos na cadela são de duas a três vezes mais freqüentes do que o observado na mulher (SCHNEIDER, 1970). Devido a este fato, muitos trabalhos utilizam a espécie canina como modelo comparativo com as lesões mamárias da espécie humana (PRIER e BRODEY, 1963; MISDORP & HART, 1979; PELETEIRO, 1994; CASSALI, 2000; GAMA *et al*, 2002

Um fator que possui grande influência no prognóstico da doença é a idade da paciente no momento do diagnóstico. A ocorrência do câncer de mama é maior em pacientes mais idosos tanto em cães como em humanos (COHEN *et al*, 1974). Segundo Lebeau (1953) os dois primeiros anos de vida da cadela correspondem a 24 anos na mulher, daí por diante, cada ano na cadela, representam quatro anos da mulher. Na espécie canina a faixa etária oscila entre 9 e 11 anos e na mulher entre 45 e 65 anos de idade. Ao utilizar-se a tabela de Lebeau (1953), verifica-se que o aparecimento dos tumores mamários nessas duas espécies ocorre em idades correspondentes (SCHNEIDER, 1970).

A frequência e a maior incidência de animais portadores de tumores mamários malignos, com metástase à distância, são baixas em comparação ao observado em medicina humana, uma vez

que é comum proceder à eutanásia de animais mediante solicitação dos proprietários, interrompendo assim, o processo da doença (THURÓCZY, 2007).

No câncer de mama, em ambas as espécies, o estudo da expressão de proteínas específicas como marcadores de fator prognóstico e preditivo têm se revelado importante ferramenta de trabalho na rotina diagnóstica e de pesquisa (KANDIOLER- ECKERSBERGER, 2000). Entre essas proteínas podemos citar: receptores hormonais (estrógeno e progesterona); proteína dos genes BRCA 1 e p53 (supressores tumorais); marcadores de proliferação celular (MIB-1/Ki67) e o proto-oncogene c-erbB-2 (CASSALI, 2000).

Outros fatores prognósticos bem estabelecidos utilizados para avaliação do câncer de mama em ambas as espécies são: tamanho do tumor, tipo histológico e graduação histológica (CAVALCANTI, 2006b).

São considerados aspectos biologicamente semelhantes nos estudos comparativos do câncer de mama humano e canino: aspectos morfológicos tanto nas lesões benignas quanto nas malignas (OWEN, 1980; GILBERTSON *et al*, 1983; MOULTON, 1990; CASSALI, 2000), a origem no sistema ductal, sendo que a lesão maligna mais frequente na mulher é o carcinoma ductal invasivo, e na cadela existe lesão semelhante histologicamente infiltrativa e com origem no ducto da glândula (STRANDBERG & GOODMAN, 1974; CASSALI, 2000)), os órgãos alvos de metástases e a evolução clínica das neoplasias (CAVALCANTI, 2006b).

Com o avanço da biologia molecular surgem novas perspectivas visando prevenção, diagnóstico precoce e tratamentos mais eficazes para o câncer de mama tanto em medicina humana quanto em medicina veterinária (CASSALI *et al* , 2007).

2.3- Marcadores Tumorais

Moléculas associadas à presença do câncer têm sido extensivamente investigadas e utilizadas na prática clínica na medicina humana por mais de 30 anos, e são definidas como marcadores tumorais (GION & DAIDONE, 2004).

Os marcadores tumorais ou biomarcadores são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em

outros líquidos biológicos, produzidos primariamente por ele ou, secundariamente pelo paciente, em resposta à presença do tumor. As concentrações dessas substâncias nos fluidos corpóreos devem refletir a extensão do tumor, respostas ao tratamento e a progressão da doença (JACOBS & HASKELL, 1991).

Um marcador tumoral pode ser utilizado, em conjunto com anamnese, exames físicos e diagnósticos de imagem, para auxiliar na identificação de uma doença específica, na detecção de metástases ocultas e recidivas, na estimativa do volume tumoral, na escolha da terapia, no acompanhamento de respostas ao tratamento ou como alvo para intervenções terapêuticas em ensaios clínicos (KOSHIDA *et al*, 1996; LINDBLOM & LILJEGREN, 2000).

A detecção do câncer parte do princípio que certas características expressas no tumor são diferentes das características do tecido normal e essas “diferenças” podem ser detectadas no tumor ou no sangue (LEVENSON, 2007). Neste caso os marcadores são denominados antígeno tumor- específico, pois estão presentes apenas em células neoplásicas (ANDRIOLO, 2008). Exemplo disso ocorre quando um oncogene é translocado, funde-se a um promotor ativo de outro gene, e neste processo maligno o gene mutado leva a produção ativa de uma proteína, com o conseqüente desenvolvimento de um clone maligno (LINDBLOM & LILJEGREN, 2000).

Em outros casos algumas proteínas são fisiologicamente sintetizadas por células diferenciadas, mas células neoplásicas as produzem em quantidades muito maiores, sendo também possível avaliar o tumor pelo aumento da expressão tecidual e/ou concentração sérica da proteína (LINDBLOM & LILJEGREN, 2000). Estes marcadores recebem o nome de antígeno tumor- associado, pois estão presentes tanto em células neoplásicas quanto em normais, diferenciando-se pela quantidade ou forma molecular com que se apresentam (ANDRIOLO, 2008).

Esta definição leva à grande diversidade dos marcadores existentes, e, para direcionar a utilidade de cada uma dessas substâncias é necessário pensar no marcador ideal (MAGRO & BENTO, 1997). Este deveria ser altamente específico para um determinado tipo de neoplasia e suficientemente sensível para detectar a presença de pequeno número de células neoplásicas, permitindo o diagnóstico precoce, em estudos populacionais (ANDRIOLO, 2008).

No entanto até o momento, não existe um marcador tumoral perfeito, mas proteínas com a maioria destas características estão disponíveis para auxiliar os oncologistas (JACOBS & HASKELL, 1991) no acompanhamento do paciente previamente diagnosticado (ANDRIOLO, 2008).

Os biomarcadores podem ser classificados em dois grandes grupos: marcadores tumorais na superfície da célula e marcadores tumorais no soro (MAGRO & BENTO, 1997). Numerosos marcadores tumorais séricos têm sido descritos para uso no câncer de mama, incluindo as mucinas (ex: CA15.3, BR27.29), proteínas oncofetais (CEA), oncoproteínas (ex: *c-erbB2*, *c-myc* e p53) e citoqueratinas (ex: TPA e TPS). Desses, o CEA e CA15.3 são os mais indicados na prática clínica (CHEUNG *et al*, 2000; MOLINA, 2005).

Na tentativa de aumentar a especificidade e sensibilidade dos testes, o Grupo Europeu de Marcadores Tumorais (EGTM) publicaram uma recomendação para o acompanhamento de pacientes com câncer de mama utilizando a combinação de dois marcadores tumorais séricos, CEA e CA15.3 (MOLINA *et al*, 2005).

O aumento da concentração sérica de algumas enzimas também pode auxiliar no acompanhamento da evolução do tumor já diagnosticado. Estas enzimas, como a fosfatase alcalina e a desidrogenase láctica, são consideradas marcadores de baixa especificidade, pois podem encontrar-se elevadas em doenças não- neoplásicas (ALMEIDA *et al*, 2007; CARVALHO, 1993; KESHAVIAH *et al*, 2007).

Em medicina humana, alterações séricas de marcadores tumorais indicados pela ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) (HARRIS *et al*, 2007) podem auxiliar na avaliação prognóstica e acompanhamento do tratamento em mulheres com câncer de mama. Apesar da alta frequência do carcinoma mamário na espécie canina e das semelhanças identificadas com a espécie humana, o número de pesquisas relacionadas a esses marcadores em medicina veterinária é escasso.

Na tabela 1 estão relacionados alguns exemplos de marcadores tumorais complementares no diagnóstico de neoplasias humanas, sua expressão e sua utilidade prática.

Tabela 1 – Marcadores tumorais com suas respectivas utilidades clínicas

Marcador Tumoral	Expressão em neoplasias	Uso potencial em neoplasias
Alfa-fetoproteína (AFP)	Câncer de células germinativas de ovário e testículo, carcinoma hepatocelular.	Auxílio na detecção e diagnóstico. Acompanhamento dos pacientes após tratamento.
Antígeno carcinoembrionário (CEA)	Câncer colo-retal, melanoma, linfoma, estômago, mama, pulmão, fígado, ovário, rins, tireóide.	Acompanhamento dos pacientes após tratamento.
Antígeno Carboidrato 125 (CA 125)	Câncer de ovário, útero, cérvix, pâncreas, fígado, colo, pulmão, mama, trato digestivo.	Monitoramento do paciente durante tratamento, identificação de recidiva.
Antígeno do câncer 15.3 (CA15.3)	Cancer de mama	Monitoramento do paciente durante tratamento, identificação de recidivas.
Antígeno carboidrato 19.9 (CA19.9)	câncer de estomago, pâncreas, trato biliar e colorretal	Monitoramento do paciente durante tratamento, identificação de recidivas.
Lactato desidrogenase (LDH)	Em quase todos os tipos de câncer	Não pode ser utilizado no diagnóstico de um tipo particular de câncer. Útil no monitoramento de Sarcoma de Ewing, linfoma não Hodgkin e leucemia.
Antígeno específico prostático (PSA)	Câncer de próstata.	Monitoramento do paciente durante tratamento, identificação de recidivas.
β -Gonadotrofina Coriônica Humana (β -HCG)	Coriocarcinoma (útero), doença trofoblástica, ovário, testículo, fígado, estômago, pâncreas e pulmão.	Triagem em mulheres com alto risco de coriocarcinoma. Avaliação do tratamento.

FONTES: MILLÁN e FISHMAN, 1995; INCA 2010

2.3.1- CA 15.3

O antígeno do câncer 15.3 (CA 15.3) é uma glicoproteína com alto peso molecular (300-400 Kd) produto do gene *MUC 1*. Embora a função fisiológica da proteína MUC 1 ainda não seja completamente esclarecida, seu papel tem sido relacionado à adesão celular, imunidade e metástases (DUFFY *et al*, 2004). A identificação do marcador tumoral CA 15.3 se dá por dois anticorpos (Ac) monoclonais: clone DF3 (Ac contra extratos purificados de uma fração isolada de membrana originária de carcinoma mamário) e clone 115D8 (Ac contra membrana de globulina de gordura do leite), detectados em imunoensaios (SOUZA, 2002). É produzida em pequenas quantidades pelas células epiteliais normais da mama (KESHAVIAH *et al*, 2007) e superexpressa por uma variedade de adenocarcinomas, especialmente os relacionados ao câncer de mama (SOUZA, 2002).

Como todo biomarcador tumoral, por não ser 100% específico, pode apresentar suas concentrações elevadas em doenças benignas como hepatite crônica, tuberculose e sarcoidose e em outras neoplasias como o câncer de ovário, colo uterino, pulmão e hepático (CHEUNG *et al*, 2000; ALMEIDA *et al*, 2007).

O CA15.3 possui importância fundamental no acompanhamento da evolução do câncer de mama na mulher, podendo preceder os sinais clínicos em até 13 meses (SOUZA, 2002; ALMEIDA *et al*, 2007) e na avaliação de falha ou sucesso terapêutico (WU *et al*, 2010). Sua sensibilidade varia de acordo com a massa tumoral e o estadiamento clínico da doença (ALMEIDA *et al*, 2007), apresentando níveis séricos elevados em 60 a 80% das pacientes com metástases em câncer de mama (CHEUNG *et al*, 2000).

Segundo trabalho realizado por Park *et al* (2008) em mulheres portadoras de carcinomas mamários, níveis séricos elevados do marcador no pré-operatório está associado a um pior prognóstico da doença. Em medicina humana a ASCO (HARRIS *et al*, 2007) recomenda a utilização do CA15.3 para monitorar pacientes com câncer de mama durante tratamento terapêutico. O marcador não descarta a avaliação clínica, anamnese e diagnósticos de imagem.

Em medicina veterinária Marchesi *et al* (2007) realizaram um trabalho de avaliação da concentração sérica e plasmática do CA15.3 em cães, com finalidade de determinar um valor de referência para este biomarcador na espécie. O estudo avaliou o marcador sérico em grupos de animais saudáveis e animais com diferentes lesões neoplásicas. No entanto, devido à diversidade dos tipos tumorais incluídos no trabalho e a não especificidade para câncer de mama, não foi possível estabelecer um parâmetro de comparação para o marcador em cadelas portadoras de carcinoma mamário.

2.3.2- CEA

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é um marcador tumoral que tem sido extensivamente estudado desde sua identificação, em 1965. É uma glicoproteína com peso molecular de 180 Kd pertencente à família das imunoglobulinas (SOUZA, 2002) e produzido pelas células normais da mucosa gastrointestinal (ALMEIDA *et al*, 2007).

Sua função ainda não está totalmente elucidada, mas alguns trabalhos indicam o envolvimento da molécula na adesão intercelular *in vitro* (VON KLEIST *et al*, 1995; SOUZA, 2002), outros autores mostram sua ação tumorigênica na inibição da diferenciação celular (CHARBONNEAU & STANNERS, 1999). Originalmente foi descrito como presente em adenocarcinoma de cólon e reto (ALMEIDA *et al*, 2007) mas ausente em tecido colônico adulto normal.

Não é considerado um antígeno órgão específico, pois sua detecção no soro correlaciona-se com várias malignidades (HARRIS *et al*, 2007). A frequência com que o nível de CEA está elevado e o valor atingido depende da extensão da doença e do grau da diferenciação (MAGRO & BENTO, 1997). Estudos demonstram que 35% a 50% das mulheres com câncer de mama apresentam elevação na concentração sanguínea deste antígeno (ALMEIDA *et al*, 2007).

Em medicina humana é usado em predileção para câncer colorretal e pulmonar (ALMEIDA *et al*, 2007). Segundo consenso da ASCO realizado em 2007 (HARRIS *et al*, 2007), seu uso é recomendado em câncer de mama para avaliação da resposta ao tratamento, indicando falha

quando apresentar-se elevado entre as primeiras 4 e 6 semanas após o início da quimioterapia. Sua especificidade e sensibilidade aumentam quando associado a outro marcador tumoral (NICOLINI *et al*, 2006) podendo ser útil, com maior eficácia, para monitorar a remoção cirúrgica do tumor, tratamento e recidivas (PARK *et al*, 2008).

Em medicina veterinária não há relatos do uso de marcador tumoral sorológico na prática clínica, e existem poucos trabalhos a respeito. Marchesi *et al* (2007) iniciaram um estudo com a finalidade de estabelecer um valor de referência para CEA sérico na espécie canina, no entanto não obtiveram êxito devido a não detecção de algumas dosagens pela baixa sensibilidade do reagente.

Por outro lado Balint *et al* (2008) realizaram um trabalho onde foi avaliado o nível sérico de CEA em caninos e felinos de um grupo com diversas neoplasias, das quais duas eram carcinomas mamários. Neste grupo as concentrações séricas de CEA estavam pelo menos duas vezes mais alta (3,0- 4,5 ng/mL) que o valor de referência estabelecido no trabalho (1,50- 1,65 ng/mL). Porém os grupos eram heterogêneos englobando as diferentes espécies, ambos os sexos, e vários tipos de tumores. Dessa forma não foi possível estabelecer um direcionamento preciso para o uso do marcador.

2.3.3- Fosfatase alcalina

As fosfatases são hidrolases que utilizam como substratos fosfomonoésteres, as quais estão amplamente distribuídas na natureza, tendo sido encontradas em animais, vegetais e em microorganismos. Estas enzimas são divididas em 3 grupos principais: fosfatases alcalinas, fosfatases ácidas e proteínas fosfatases (AOYAMA *et al*, 2003).

A fosfatase alcalina está amplamente distribuída nos tecidos humanos, notadamente na mucosa intestinal, fígado, túbulos renais, baço, ossos (osteoblastos) e placenta. A forma predominante no soro em adultos normais origina-se, principalmente, do fígado e esqueleto. Sua função metabólica está associada ao transporte lipídico no intestino e com processos de calcificação óssea (MOTTA, 2000).

Em medicina humana, há trabalhos referentes ao uso da fosfatase alcalina como um indicador sensível para o câncer, principalmente em casos de obstrução dos ductos biliares e alterações na função hepática (KESHAVIAH *et al*, 2007). Alguns autores consideram que esta enzima seja um marcador tumoral de baixa especificidade, pois sua concentração sanguínea se altera em várias malignidades, no entanto, têm interesse em acompanhar a evolução de tumores já conhecidos (MAGRO, 1997).

Um estudo conduzido pelo Grupo Internacional de Estudo do Câncer de Mama (IBCSG) avaliou a sensibilidade da fosfatase alcalina na detecção de recorrência de câncer de mama. Como conclusão observaram que a enzima estava aumentada em pacientes que apresentavam metástase (principalmente óssea e hepática) comparando com as pacientes com melhor prognóstico (CRIVELLARI *et al*, 1995).

2.3.4- LDH

A desidrogenase láctica (LDH) é uma enzima que cataliza o último passo da glicólise, onde o piruvato é reduzido à lactato (RIDGWAY, 1985). Está presente no citoplasma de todas as células do organismo, sendo rica no miocárdio, fígado, músculo esquelético, rim e eritrócitos. Os níveis teciduais de LDH são, aproximadamente, 500 vezes maiores do que os encontrados no soro, e lesões teciduais provocam elevações plasmáticas significantes desta enzima (MOTTA, 2000). Apresenta frequentemente seus níveis séricos aumentados em pacientes com câncer (KOUKOURAKIS *et al*, 2009).

Sob o ponto de vista bioquímico, a célula neoplásica apresenta uma elevada taxa de glicólise comparada à célula sadia (CARVALHO, 1993). Embora a conversão de piruvato em lactato ocorra nas células normais em condições de hipóxia, as células tumorais produzem grandes quantidades de lactato, mesmo quando há oxigênio, não sendo este portanto um fator limitante (FANTIN *et al*, 2006). Em neoplasias a LDH pode estar relacionada com o volume do tumor, podendo apresentar implicações prognósticas muito importantes. No entanto, por não ser específico, este teste não pode ser usado como valor diagnóstico. Em pacientes portadores de

câncer, altos níveis de LDH anteriores ao tratamento comprovam consistentemente ser um fator de risco adverso, e refletem presumivelmente a taxa de crescimento tumoral (ALMEIDA *et al*, 2007).

No entanto, a regulação do nível sérico enzimático depende de duas variáveis: produção e metabolização. A LDH é preferencialmente retirada da circulação e metabolizada pelas células do sistema retículo-endotelial; assim, seu nível sérico elevado encontrado em diversas situações neoplásicas deve-se não só ao aumento de produção pela excessiva massa celular tumoral, como também pela diminuição do *clearance* enzimático que decorre da disfunção da medula óssea, fígado e sistema imune promovida pela doença neoplásica de base (CARVALHO, 1993).

2.4- Estado nutricional

Os efeitos metabólicos, endocrinológicos e hematológicos, conseqüentes à presença do tumor primário, em locais distantes à ele, são conhecidos por síndromes paraneoplásicas (RAMOS *et al*, 2008). A caquexia é um exemplo dessa síndrome, que se caracteriza clinicamente pela perda progressiva de peso, mesmo com ingestão aparentemente adequada de nutrientes, anorexia, emaciação, fraqueza, cansaço, mau desempenho e função imune comprometida. Isso se deve à alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios (ANTUNES & MORENO, 2009).

É a síndrome paraneoplásica mais comum em medicina veterinária (PUCCIO & NATHANSON, 1997; ANTUNES *et al*, 2009) sendo um indicativo de pior prognóstico, pois ao comparar pacientes com neoplasias semelhantes, os que apresentam o quadro caquético, têm resposta diminuída ao tratamento, pior qualidade de vida e menor tempo de sobrevida (OGILVIE & MOORE, 1995).

Neste quadro de desnutrição, a degradação de proteínas geralmente excede a sua síntese, resultando em perda de massa corporal, diminuição na síntese de proteínas e balanço de nitrogênio alterado (OGILVIE & VAIL, 1990). A perda líquida de proteínas provoca diminuição na imunidade humoral, na função gastrointestinal e na cicatrização de feridas.

A perda de proteínas corporais manifesta-se clinicamente como atrofia dos músculos esqueléticos, hipoalbuminemia, hipoproteinemia, velocidade reduzida na cicatrização e infecções frequentes. Assim, os pacientes com câncer têm alterações no metabolismo proteico que podem gerar sérios riscos à saúde (ANTUNES *et al*, 2009).

Neste contexto, a avaliação nutricional é o primeiro passo para a identificação da desnutrição e é usualmente feita pela combinação de parâmetros clínicos, antropométricos e laboratoriais (INUI, 1999), como dosagens de testes séricos como proteínas totais e albumina (KANEKO *et al*, 1997).

2.4.1- Proteínas totais

As proteínas são compostos indispensáveis à vida, representando a base da estrutura de células, tecidos e órgãos. Funcionam como catalisadores enzimáticos nas reações bioquímicas, carreadores de muitos constituintes do plasma e na defesa orgânica como anticorpos (KANEKO *et al*, 1997; NAKAGE *et al*, 2005). São sintetizadas pelos hepatócitos e secretadas na circulação, sendo distribuída 40% nos músculos, 10% nos órgãos, 30% na pele e 20 % no sangue (FUHRMAN *et al*, 2004)

Pelo significado biológico e múltiplas funções exercidas no sistema orgânico, a avaliação dos níveis séricos das proteínas totais e de suas frações (albumina, alfa globulinas, beta globulinas e gama globulinas), representa um importante auxílio ao diagnóstico clínico para avaliação do estado nutricional de pacientes portadores de câncer (KANEKO *et al*, 1997).

A determinação das concentrações séricas de proteínas vem se tornando um procedimento valioso para o entendimento dos processos fisiopatológicos, sendo utilizada em animais sadios e doentes (NAKAGE *et al*, 2005) É considerado um procedimento rápido e prático, podendo ser repetida inúmeras vezes (WINKLER *et al*, 1989).

A concentração de proteínas séricas não é afetada somente pelo balanço entre a síntese e degradação, mas também por mudanças na quantidade e na distribuição dos fluidos corporais, por

mudanças na permeabilidade capilar, por perdas externa e por retorno linfático (RAGUSO, 2003). Pesquisas têm evidenciado que a qualificação e a quantificação de proteínas séricas podem subsidiar o diagnóstico e trazer valiosas informações prognósticas e de monitoramento de doenças como o câncer (ECKERSALL, 2000; NAKAGE *et al*, 2005).

2.4.2- Albumina

A albumina é a proteína mais abundante no sangue, constituindo cerca de 35- 50% das proteínas no plasma de cães saudáveis. É fundamental para a manutenção da pressão osmótica, necessária para a distribuição correta dos líquidos corporais entre o compartimento intravascular e o extravascular é a maior fonte de aminoácidos que pode ser utilizado pelo corpo (CERÓN *et al*, 2005).

Tecles *et al* (2009) realizaram um trabalho avaliando as concentrações séricas de proteínas de fase aguda em cadelas portadoras de câncer de mama em diferentes estadios. Observaram como resultado a concentração diminuída de albumina sérica no grupo de cadelas em estadio avançado (apresentando metástase), quando comparado às cadelas saudáveis ou sem metástases.

Em medicina humana, além de testes físicos, como a variação de peso corpóreo, a albumina sérica é um dos parâmetros utilizados para avaliar o estado nutricional de pacientes portadores câncer. Isso se deve ao baixo custo do teste e a alta acurácia (na ausência de disfunção hepática e/ou renal) (SILVA, 2006). No entanto, a albumina apresenta uma meia vida de 19 a 20 dias e o seu aumento é lento, sendo seu uso adequado somente para avaliar a variação do estado nutricional a longo prazo (OTA *et al*, 1985).

3- HIPÓTESE

O grupo de cadelas com câncer de mama em estadio avançado (com metástase à distância) apresentará níveis aumentados da concentração sérica de CEA, CA15.3, fosfatase alcalina e LDH, enquanto as dosagens sérica de proteínas totais e albumina estarão diminuídas.

4- OBJETIVOS

4.1- Objetivo Geral:

Avaliar os níveis de CEA, CA15.3, fosfatase alcalina, LDH, proteína e albumina em cadelas portadoras de neoplasias mamárias malignas – primárias ou metastáticas.

4.2- Objetivos Específicos:

- Quantificar as concentrações séricas de CA15-3 e CEA pela técnica de ELISA e fosfatase alcalina e LDH pelo método cinético, comparativamente entre os grupos de cadelas hígdas, cadelas com câncer de mama sem metástase ($T_{1,2,3}N_0M_0$), cadelas com câncer de mama e metástase regional ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_0$) e cadelas com câncer de mama e metástase à distância ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_1$),
- Avaliar o perfil protéico com dosagens séricas de proteínas totais e albumina em cadelas hígdas, cadelas com câncer de mama sem metástase ($T_{1,2,3}N_0M_0$), cadelas com câncer de mama e metástase regional ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_0$) e cadelas com câncer de mama e metástase à distância ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_1$),
- Correlacionar as dosagens séricas dos testes CA15.3 e CEA nas cadelas hígdas, cadelas com câncer de mama sem metástase ($T_{1,2,3}N_0M_0$), cadelas com câncer de mama e metástase regional ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_0$) e cadelas com câncer de mama e metástase à distância ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_1$).

5- MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização das coletas amostrais, o presente trabalho contou com o apoio dos Hospitais Veterinários da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerias (UFMG) e da Escola de Veterinária da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Os procedimentos foram

realizados no Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (LPC/ ICB/ UFMG) e no Laboratório de Análises Clínicas Francis no SESC de Belo Horizonte /MG.

5.1. Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal (CETEA/UFMG), sob protocolo de nº 258/08 (Anexo 1).

5.2. Seleção dos Casos

Participaram do trabalho 67 cadelas, selecionadas casualmente, sem predileção de raça e com faixa etária mínima de 6 anos, que deram entrada no Hospital Veterinário da UFMG ou no Hospital Veterinário da UFBA. Os animais foram divididos em 4 grupos com os seguintes critérios de inclusão:

-Grupo I- Cadelas sem câncer de mama (n= 10): Cadelas submetidas à ovariectomia ou exame de rotina não apresentando nenhuma evidência de câncer;

- Grupo II- Cadelas com câncer de mama sem metástase (n= 41): Cadelas submetidas à cirurgia para exérese tumoral, com diagnóstico histopatológico compatível para carcinomas mamários (independente do tipo tumoral), linfonodos regionais (axilares e inguinais) sem alteração aparente e radiografia torácica sem evidências de metástase;

- Grupo III- Cadelas com câncer de mama e metástase regional (n=9): Cadelas submetidas à cirurgia para exérese tumoral, com diagnóstico histopatológico positivo para câncer de mama (independente do tipo tumoral), com metástase em linfonodo(s) regional(is) e radiografia torácica sem evidências de metástase;

- Grupo IV- Cadelas com câncer de mama e metástase à distância (n=8): Cadelas

submetidas à cirurgia para exérese tumoral, com diagnóstico histopatológico positivo para câncer de mama (independente do tipo tumoral), com metástase em linfonodo(s) à distância e/ou radiografia torácica apresentado áreas radiopacas sugestivas de metástase.

Os diagnósticos foram liberados por médicos veterinários patologistas do Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (LPC/ ICB/ UFMG). Os critérios utilizados para o diagnóstico das lesões seguiram as propostas de Misdorp et al (1999).

5.3. Coleta do material

A coleta do material foi realizada no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG e Escola de Veterinária da UFBA, no momento pré-cirúrgico (nas cadelas dos grupos II, III e IV) e em cadelas que realizavam exames de rotina (cadelas do grupo I).

As amostras foram colhidas por punção venosa, após a anti-sepsia com solução de álcool-iodado. Utilizou-se tubos plásticos de coleta à vácuo (*Vacutainer*) de 10mL, sem anti-coagulante, e agulhas descartáveis de 0,7 x 25 mm. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 3000rpm, o soro aliquoteado e armazenado em dois tubos *eppendorf* devidamente identificados com o nome da cadela e seu número de identificação da ficha clínica. O soro foi colhido com o cuidado de evitar hemólise e a centrifugação realizada após retração do coágulo. Uma das amostras foi encaminhada para realização dos testes enzimáticos LDH e fosfatase alcalina no mesmo dia da coleta, o outro, congelado em temperatura abaixo de -20° C para realização, após a liberação do diagnóstico, de proteínas totais, albumina, CEA e CA15.3.

5.4. Testes laboratoriais

O material colhido foi encaminhado para processamento no Laboratório de Análises Clínicas Francis (SESC- MG). O transporte das amostras foi realizado em curto tempo (máximo de 1 hora após retirada do refrigerador) utilizando-se caixa térmica com bolsa de gelo.

As dosagens séricas foram realizadas segundo protocolo de cada fabricante. Juntamente com toda bateria de teste foi dosada uma amostra de soro controle (do próprio *Kit*), com intervalo de concentração conhecido.

5.4.1. CA15.3

O teste ELISA CA 15-3 é baseado no princípio de ensaio de fase sólida não competitivo baseado na técnica direta de sanduíche. O sistema utiliza anticorpo monoclonal direcionado contra um determinante antigênico específico na molécula intacta de CA 15-3, usada para imobilização da fase sólida nas microcavidades. Os padrões, controles e as amostras são incubadas juntamente com anti- CA15.3 anticorpo monoclonal ligada a Biotina (MAb, derivado de rato), na microplaca impregnada com Streptavidina. O padrão de CA15.3 e a amostra são absorvidos pela Streptavidina que recobre a microplaca e o anti-CA15.3 ligado a biotina MAb durante a incubação.

Após incubado, o excesso de anticorpos marcados não ligados é removido com lavagens (solução tampão Tris- HCL com Tween 20). Adiciona-se, então, o substrato/cromógeno TMB (Peróxido de hidrogênio e 3,3',5,5' tetra zetilbenzidina) em cada cavidade da microplaca, com isso inicia-se a reação enzimática. Durante a reação há o desenvolvimento de uma coloração azul se o antígeno estiver presente. A intensidade da cor é proporcional a quantidade de CA15.3 presente na amostra. Utiliza-se por fim uma solução de parada (ácido clorídrico 0,12 M), com finalidade de interromper a reação enzimática. As absorbâncias são medidas espectrofotometricamente em filtro 405 nm.

A concentração das amostras das pacientes é obtida através da leitura na curva padrão (valor da absorbância versus a concentração de cada padrão). O procedimento do ensaio segue descrito abaixo:

- 1- Primeiramente ter o cuidado de deixar os reagentes em temperatura ambiente antes do uso,

- 2- Preparar os reagentes para uso:
 - 2.1- Solução de Lavagem: colocar 50 mL de solução de lavagem concentrada dentro de um frasco limpo e diluir 25 vezes adicionando 1200 mL de água destilada ou deionizada. Armazenar por até 2 semanas a uma temperatura de 2-25°C em frasco fechado,
 - 2.2- Preparação da amostra: diluir as amostras 1:41 através da mistura de 25µL da amostra com 1mL de diluente da amostra,
 - 2.3- Solução de anticorpos: Preparar o volume de anticorpos necessário através da mistura 50µL da solução *Tracer* com 1mL de solução Biotina Anti CA15.3 por tira. Estável por até 3 semanas a uma temperatura de 3 a 8°C,
- 3- Pipetar 25µL dos calibradores, controles e amostras diluídas dentro das cavidades da placa de ELISA,
- 4- Pipetar 100µL da solução de anticorpos em cada cavidade. Cobrir a microplaca com o filme aderente e agitar por 5 minutos,
- 5- Incubar por 2 horas à temperatura ambiente (20- 25°C),
- 6- Efetuar o processo de lavagem, esvaziando o poço por aspiração e inverter cuidadosamente por um tempo em papel toalha limpo. Adicionar 300µL de solução de lavagem em cada cavidade, esvaziar por aspiração e repetir este procedimento 5 vezes. Depois da execução inverter a microplaca sobre um papel toalha por algum tempo,
- 7- Pipetar 100µL do substrato (TMB HRP) em cada poço de reação. Sendo que o tempo de pipetagem não exceda 10 minutos,
- 8- Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente em local sem iluminação,

9- Pipetar 100µL de solução de parada em cada pocinho, homogeneizar cuidadosamente (este passo bloqueia a reação enzima substrato),

10- Realizar a leitura dentro de 15 minutos em comprimento de onda de 405 nm.

As amostras foram obtidas de preferência sem lipemia, icterícia ou hemólise, a fim de evitar interferências nos resultados. O equipamento utilizado para leitura do teste foi o aparelho Labmax 240[®] (Labtest Diagnóstica). Os resultados foram expressos em U/mL.

Para câncer de mama na espécie canina os valores de CA15.3 não possuem uma referência estabelecida. Os valores obtidos foram comparados com o grupo controle do próprio trabalho (cadela sem câncer de mama).

5.4.2- CEA

O ensaio imunoenzimático de CEA é baseado no princípio de ensaio de fase sólida não competitivo baseado na técnica direta de sanduíche. Os padrões, controles e as amostras são incubadas juntamente com anticorpo monoclonal Biotinilado anti- CEA conjugado com peroxidase (MAb derivado de rato), na microplaca impregnada com Streptavidina. Após incubado, o excesso de anticorpos marcados não ligados é removido com lavagens (solução tampão Tris- HCL com Tween 20). Adiciona-se, então, o substrato/cromógeno TMB (Peróxido de hidrogênio e 3,3',5,5' tetra zetilbenzidina) em cada cavidade da microplaca, com isso inicia-se a reação enzimática. Durante a reação há o desenvolvimento de uma coloração azul se o antígeno estiver presente. A intensidade da cor é proporcional a quantidade de CEA presente na amostra. Utiliza-se por fim uma solução de parada (ácido clorídrico 0,12 M), com finalidade de interromper a reação enzimática. As absorbâncias são medidas espectrofotometricamente em filtro 405 nm.

A concentração das amostras das pacientes é obtida através da leitura na curva padrão (valor da absorbância versus a concentração de cada padrão). O procedimento do ensaio segue descrito abaixo:

- 1- Primeiramente ter o cuidado de deixar os reagentes em temperatura ambiente antes do uso,
- 2- Preparar os reagentes para uso:
 - 2.1- Solução de Lavagem: colocar 50 mL de solução de lavagem concentrada dentro de um frasco limpo e diluir 25 vezes adicionando 1200 mL de água destilada ou deionizada. Armazenar por até 2 semanas a uma temperatura de 2-25°C em frasco fechado,
 - 2.2- Solução de anticorpos: Preparar o volume de anticorpos necessário através da mistura 50µL da solução *Tracer* com 1mL de solução Biotina Anti CEA por tira. Estável por até 3 semanas a uma temperatura de 3 a 8°C,
- 3- Pipetar 25µL dos calibradores, controles e amostras dentro das cavidades da placa de ELISA,
- 4- Pipetar 100µL da solução de anticorpos em cada cavidade. Cobrir a microplaca com o filme aderente e agitar por 5 minutos,
- 5- Incubar por 1 hora à temperatura ambiente (20- 25°C),
- 6- Efetuar o processo de lavagem, esvaziando o poço por aspiração e inverter cuidadosamente por um tempo em papel toalha limpo. Adicionar 300µL de solução de lavagem em cada cavidade, esvaziar por aspiração e repetir este procedimento seis vezes. Depois da execução inverter a microplaca sobre um papel toalha por algum tempo,
- 7- Pipetar 100µL do substrato (TMB HRP) em cada poço de reação. Sendo que o tempo de pipetagem não exceda 5 minutos,
- 8- Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente em local sem iluminação, em agitação constante,

9- Pipetar 100µL de solução de parada em cada poço, homogeneizar cuidadosamente (este passo bloqueia a reação enzima substrato),

10- Realizar a leitura dentro de 15 minutos em comprimento de onda de 405 nm.

As amostras foram obtidas de preferência sem lipemia, icterícia ou hemólise, a fim de evitar interferências nos resultados. O equipamento utilizado para leitura do teste foi o aparelho Labmax 240[®] (Labtest Diagnóstica). Os resultados foram expressos em ng/mL.

Para câncer de mama na espécie canina os valores de CEA não possuem uma referência estabelecida. Os valores obtidos foram comparados com o grupo controle do próprio trabalho (cadela sem câncer de mama).

5.4.3. Fosfatase alcalina

A dosagem de fosfatase alcalina foi realizada pelo método cinético- colorimétrico (Roy modificado) utilizando kits comerciais da Analisa Gold[®] para diagnóstico humano. O princípio do teste baseia-se na atuação da fosfatase alcalina do soro que hidrolisa o substrato de timolftaleína monofosfato, liberando timolftaleína e fosfato inorgânico. Pela adição de álcali, a ação enzimática é inibida e a timolftaleína adquire cor azul, cuja absorbância é medida fotometricamente. A cor do produto final da reação é resultante da mistura de cor azul e a cor própria do substrato.

O analito é estável por 7 dias entre 2-8°C. Como critério de rejeição das amostras foi levado em consideração a hemólise, que poderia interferir nos resultados devido à fosfatase alcalina eritrocitária.

O equipamento utilizado para realização do teste foi o aparelho Labmax 240[®] (Labtest Diagnóstica) com comprimento de onda de 590 nm. Os resultados foram expressos em U/L e a reação é linear até 1500 U/L. O valor de referência para fosfatase alcalina na espécie canina é de 20 a 156 U/L (KANEKO, 1997).

5.4.4. LDH

A dosagem de LDH foi realizada pelo método cinético utilizando kits comerciais da Analisa Gold[®] para diagnóstico humano. A LDH catalisa a redução do piruvato com o NADH, obtendo-se lactato e NAD⁺ (Piruvato + NADH + H⁺ $\xrightarrow{\text{LDH}}$ Lactato + NAD⁺). A concentração catalítica se determina a partir da velocidade de decomposição do NADH, medida pela queda da absortividade a 340 nm.

O analito é estável por 24 horas entre 2-8°C. Como critério de rejeição das amostras foi levado em consideração a hemólise e a demora na separação do soro, o que poderia ocasionar em resultados falsamente elevados devido à alta concentração de LDH eritrocitário.

O equipamento utilizado para realização do teste foi o aparelho Labmax 240[®] (Labtest Diagnóstica). Os resultados foram expressos em U/L e a reação é linear até 1250 U/L.

O valor de referência para LDH na espécie canina é de 45 a 233 U/L (KANEKO, 1997).

5.4.5- Proteínas totais

A dosagem de proteína foi realizada pelo método colorimétrico (metodologia Biureto) com Kits da Bioclin[®] para diagnóstico humano. O princípio do teste baseia-se na reação dos íons cobre (Cu⁺²) em meio alcalino (reagente de Biureto) com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura, que tem absorbância máxima em 545 nm, proporcional à concentração das proteínas na amostra.

O analito é estável por 7 dias entre 2-8°C, e por 60 dias em temperaturas abaixo de 10°C negativos. As amostras foram obtidas de preferência sem lipemia, icterícia ou hemólise, a fim de evitar interferências nos resultados.

O equipamento utilizado para realização do teste foi o aparelho Labmax 240[®] (Labtest Diagnóstica). Os resultados foram expressos em g/dL e a reação é linear até 14,0 g/dL. O valor de referência para proteínas totais na espécie canina é de 5,4 a 7,1 U/L (KANEKO, 1997).

5.4.6- Albumina

A dosagem de albumina foi realizada pelo método colorimétrico (metodologia verde de bromocresol) com Kits da Bioclin[®] para diagnóstico humano. O princípio do teste baseia-se na reação da albumina com o verde de bromocresol em meio ácido, formando um complexo corado permitindo assim a dosagem da albumina espectrofotometricamente em 630 nm, e é diretamente proporcional à concentração da albumina na amostra.

O analito é estável por 3 dias entre 2-8°C, e por 60 dias em temperaturas abaixo de 10°C negativos. As amostras foram obtidas de preferência sem lipemia, icterícia ou hemólise, a fim de evitar interferências nos resultados.

O equipamento utilizado para realização do teste foi o aparelho Labmax 240[®] (Labtest Diagnóstica). Os resultados foram expressos em g/dL e a reação é linear até 6,0 g/dL. O valor de referência para albumina na espécie canina é de 2,3 a 3,8g/dL (KANEKO, 1997).

5.5. Análise estatística

O delineamento experimental proposto foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro grupos. Para avaliação da normalidade os testes passaram pelo teste D'Agostino & Pearson *omnibus normality test* e foram submetidos a análise de variância ANOVA do software de estatística *Grav Pad Instat* v. 5.0 pelo teste Student-Newman-Kewls (SNK) e Tukey (CEA, que passou no teste de normalidade após sofrer transformação logarítmica).

Para determinar se existem resultados estatisticamente significativos, utilizou-se o nível de significância de 5%. Assim, consideraram-se como significativas as associações e concordâncias cuja probabilidade de significância do teste, p-valor, é menor que 0,05.

Para avaliar a associação entre os testes CEA e CA15.3, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson.

6- RESULTADOS

Dentre os tumores diagnosticados, tipo mais freqüente foi o carcinoma em tumor misto (29/57; 50,87%) (Tab. 2). Segundo MISDORP *et al*, 1999, os tumores mistos da mama da cadela correspondem à proliferação de células morfológicamente similares a elementos epiteliais (luminais ou mioepiteliais) e células mesenquimais que podem produzir cartilagem e/ ou tecido ósseo e/ ou tecido adiposo, em combinação com tecido fibroso.

A idade dos animais acometidos (n=57) no momento da cirurgia oscilou entre 6 a 15 anos (média 10 anos $\pm$ 2,30) e as cadelas do grupo que não apresentavam neoplasias mamárias (n=10) obtiveram média de idade de 6 anos $\pm$ 2. A raça não foi utilizada como critério de seleção, sendo observada uma maior freqüência da raça poodle (28/57; 41,7%) seguida da SRD (sem raça definida) (13/57; 19,40%). As oito cadelas do grupo IV (T_{1,2,3}N_{1,2}M₁) apresentaram metástases em linfonodos distantes, não havendo nenhum caso de metástase pulmonar ou hepática.

Tabela 2: Freqüência dos tipos histológicos dos tumores mamários nas cadelas em estudo (n= 57)

Diagnóstico	Freqüência	%
Carcinossarcoma	1	1,70
Carcinoma em tumor misto	29	50,87
Carcinoma in situ	6	10,52
Carcinoma tubular	6	10,52
Carcinoma túbulo- papilar	5	8,77
Carcinoma papilar	2	3,50
Carcinoma micropapilar	2	3,50
Carcinoma sólido	2	3,50
Carcinoma sólido tubular	3	5,26
Carcinoma secretor	1	1,75
Total	57	100,0

As dosagens séricas dos testes enzimáticos fosfatase alcalina e LDH não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos (teste NKS: $p > 0,05$) (Tab. 3). No entanto, houve uma tendência no aumento da concentração sérica da enzima LDH conforme o avanço no estadiamento da doença como pode ser observado no gráfico 1.

Tabela 3: Média e desvio das dosagens séricas de fosfatase alcalina e LDH nas cadelas dos grupos I, II, III e IV

Grupo (n)	Fosfatase alcalina (U/L)	LDH (U/L)
Grupo I (10)	92,5± 53,96 (a)	236,9± 112,1 (a)
Grupo II (41)	77,48± 46,12 (a)	282,1±163,9 (a)
Grupo III (9)	117,8± 85,57 (a)	384,4± 268,6 (a)
Grupo IV (8)	77,1± 36,40 (a)	414,0± 178,8 (a)

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao valor de $p < 0,05$. Grupo I: cadelas sem câncer de mama; grupo II: cadelas com câncer de mama sem metástase; grupo III: cadelas com câncer de mama e metástase regional; grupo IV: cadelas com câncer de mama e metástase à distância.

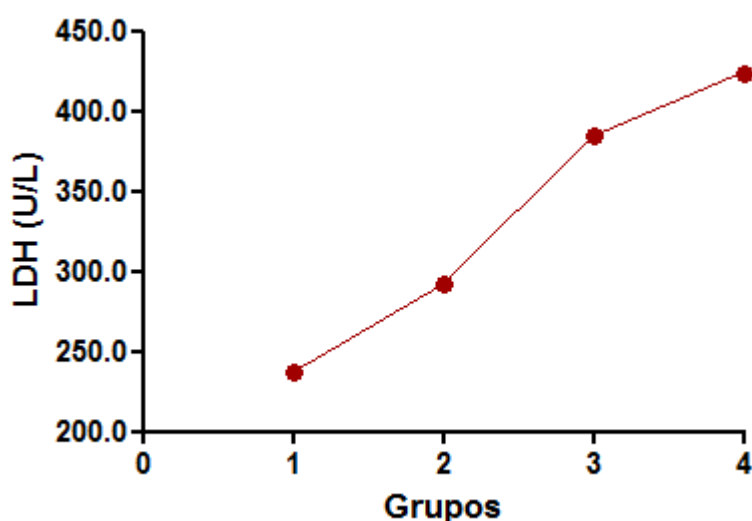


Gráfico 1: Médias das concentrações séricas de LDH nas cadelas dos grupos I, II, III e IV

O teste CEA não apresentou distribuição normal, sendo submetido à transformação logarítmica e posteriormente analisado estatisticamente, não apresentando diferença significativa entre os grupos (teste Tukey: $p > 0,05$) (Tab. 3).

A concentração sérica de CA15.3 foi significativamente maior no grupo IV ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_1$) quando comparado com os grupos I (T_0) ($p = 0,0029$) e II ($T_{1,2,3}N_0M_0$) ($p = 0,0095$), enquanto os grupos I (T_0), II ($T_{1,2,3}N_0M_0$) e III ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_0$) não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$) (Tab.4).

Tabela 4. Média e desvio padrão das dosagens séricas de CEA e CA15.3 nas cadelas dos grupos I, II, III e IV

Grupo (n)	CEA (ng/mL)	CA15.3 (ng/mL)
Grupo I (10)	0,08± 0,04 (a)	1,37± 0,46 (a)
Grupo II (41)	0,12± 0,12 (a)	1,61± 0,61 (a)
Grupo III (9)	0,11± 0,13 (a)	2,01± 0,79 (ab)
Grupo IV (8)	0,07± 0,04 (a)	2,46± 1,00 (b)

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao valor de $p < 0,05$.

Grupo I: cadelas sem câncer de mama; grupo II: cadelas com câncer de mama sem metástase; grupo III: cadelas com câncer de mama e metástase regional; grupo IV: cadelas com câncer de mama e metástase à distância.

As dosagens de proteínas totais não evidenciaram alterações estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$). No entanto, a concentração sérica de albumina foi significativamente maior no grupo II ($T_{1,2,3}N_0M_0$) (teste SNK: $p = 0,014$) quando comparado com os grupos I (T_0), III ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_0$) e IV ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_1$) (Tab. 5).

Tabela 5. Média e desvio das dosagens séricas de proteínas totais e albumina nas cadelas dos grupos I, II, III e IV

Grupo (n)	Proteína(g/dL)	Albumina (g/dl)
Grupo I (10)	6,45± 1,08 (a)	2,78± 0,32 (a)
Grupo II (40)	6,02± 1,01 (a)	3,30± 0,69(b)
Grupo III (9)	6,26± 0,597 (a)	2,70± 0,42(a)
Grupo IV (8)	6,76± 1,36 (a)	2,71± 0,59 (a)

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao valor de $p < 0,05$.

Grupo I: cadelas sem câncer de mama; grupo II: cadelas com câncer de mama sem metástase; grupo III: cadelas com câncer de mama e metástase regional; grupo IV: cadelas com câncer de mama e metástase à distância.

O aumento da concentração sérica de CEA e CA15.3 apresentou correlação positiva entre os grupos, porém fraca e sem poder estatístico para o p considerado ($r = 0,056$; $p = 0,653$) (Graf.2).

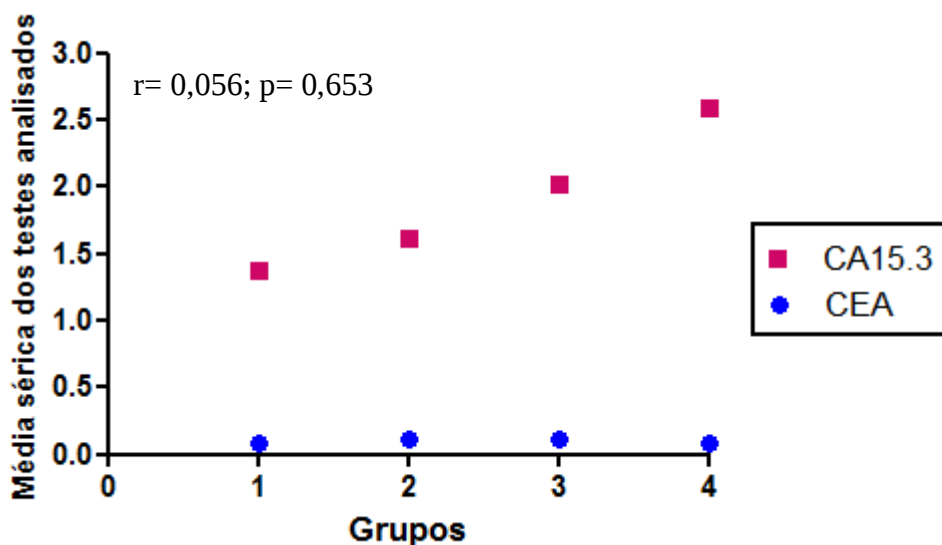


Gráfico 2: Correlação entre as concentrações séricas de CEA e CA15.3 em cadelas portadoras de carcinoma mamário nos quatro grupos analisados.

7- DISCUSSÃO

A biopatologia dos tumores mamários caninos interessa à comunidade científica em geral pelo fato destes tumores terem sido propostos como modelo comparativo para o estudo do câncer de mama na mulher. Estes estudos são possíveis devido às semelhanças epidemiológicas e biológicas dos tumores de mama das duas espécies (CASSALI, 2000).

Adicionalmente, existe um grande interesse, por parte dos proprietários, na possibilidade de um acompanhamento da evolução tumoral e do tratamento, priorizando melhorar a sobrevida e aumentar o tempo livre de doença no seu animal de estimação. A realização de alguns testes sorológicos auxilia na avaliação do desenvolvimento das neoplasias, possibilita a detecção de metástases e recidivas (SAFI, *et al*, 1991) e são úteis para avaliar a progressão da doença frente ao tratamento (HARRIS, *et al*, 2007).

O propósito inicial desta pesquisa foi avaliar as concentrações séricas de marcadores tumorais da espécie humana em cadelas com câncer de mama primário e metastático. Estes testes devem ser sensíveis e específicos para tumores mamários e principalmente de baixo custo possibilitando assim seu uso rotineiro em pacientes oncológicos na medicina veterinária, com finalidade de auxiliar no diagnóstico e acompanhamento da evolução de neoplasias mamárias.

O marcador tumoral CA15.3 é amplamente estudado em medicina humana desde a década de 80, porém em medicina veterinária existem poucas referências a respeito. No presente estudo os resultados evidenciaram diferença estatística significativa entre os grupos controle e cadelas com câncer de mama e metástase à distancia ($p = 0,0220$) e grupos de cadelas com câncer de mama sem metástase e o grupo com metástase à distância ($p = 0,0078$) sugerindo que a elevação na concentração sanguínea do marcador seja proporcional ao estadiamento clínico da doença. Este dado está de acordo com Almeida *et al* (2007) que afirmam que, em medicina humana, a concentração sérica de CA15.3 varia de acordo com o estadiamento da paciente, estando elevado entre 5% a 30% do valor normal no estadio I, 15% a 50% no estadio II, 60% a 70% no estadio III, e de 65% a 90% no estádio IV e que, além disso, concentrações séricas muito elevadas estão associadas à pior sobrevida.

Marchesi *et al* (2007) realizaram um estudo com objetivo de estabelecer um protocolo para o uso de CA15.3 na clínica veterinária, obtendo uma média de concentração sérica do marcador em cães sem doença neoplásica de $2,77 \pm 0,28$. Este resultado difere com os dados obtidos em nosso trabalho, onde, para cadelas híginas a média sérica de CA15.3 foi de $1,37 \pm 0,46$. Esta divergência pode ter ocorrido principalmente devido à diferença entre as metodologias utilizadas na técnica de ELISA, como o emprego de reagentes distintos.

O papel do marcador tumoral CEA em doenças neoplásicas foi estudado por Balint *et al* (2008), que realizaram dosagens séricas do marcador e observaram um aumento significativo de sua concentração em animais portadores de neoplasias. Porém, no estudo de Balint *et al* (2008) os grupos comparados eram heterogêneos pois englobavam animais de diferentes sexos, espécies felina e canina e vários tipos de tumores em diferentes estadiamentos. Em nossos dados, avaliando somente neoplasias mamárias em cadelas, não foi observado diferença estatística significativa entre os grupos analisados.

Deve-se considerar que os níveis de CEA sérico são influenciados pelo ritmo e quantidade de sua produção pelas células do carcinoma, pela existência da necrose tumoral e pela infiltração perivascular. Outros fatores que também podem influenciar na determinação do nível sérico de CEA é o metabolismo hepático e o ritmo de eliminação renal (WAISBERG *et al*, 2002).

As dosagens de LDH apresentaram uma tendência no aumento da concentração sérica acompanhando a evolução da doença. Este dado está de acordo com a afirmação de Magro e Bento (1997) onde a enzima seria um marcador tumoral de baixa especificidade, apresentando aumento de suas concentrações na corrente sanguínea com a evolução da doença, indicando pior prognóstico. Da mesma forma, Carvalho (1993) afirmou que experimentalmente observa-se que as células neoplásicas têm uma taxa de glicólise elevada e uma sugestiva elevação da atividade da enzima LDH. Apesar desta observação importante, a enzima não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos analisados.

Keshaviah *et al* (2007) afirmam que a enzima fosfatase alcalina seria um melhor marcador nos

casos em que há metástases hepática ou ósseas. Em mulheres com câncer de mama um dos principais sítios de metástases são os ossos (ARAUJO *et al*, 2007), já em cadelas a ocorrência é rara (NOWAK *et al*, 2007). Concordando com esses dados, nosso trabalho não apresentou nenhuma paciente com metástase óssea. Este fato pode ter influenciado nos resultados obtidos nos quais não foi observado diferença estatística da enzima entre os grupos ($p > 0,05$).

Outro dado analisado foi o perfil protéico das pacientes no momento cirúrgico. Em pacientes oncológicos na medicina humana é comum observar síndromes paraneoplásicas como a caquexia (ARGILES & LOPEZ- SORIANO, 1999), o que causa uma diminuição na concentração sérica de proteína e albumina. A albumina é produzida exclusivamente pelo fígado e excretada pelo trato gastrointestinal e pelos rins. Após sintetizada, cerca de 40 a 50% da albumina é retida no espaço intravascular e grande parte é destinada principalmente à musculatura esquelética (ROTHSCHILD *et al*, 1979; KAYSEN, 2002). Alterações na condição de hidratação, alimentação e nas taxas de síntese e catabolismo podem ser fatores que influenciam nas concentrações séricas de albumina.

Os resultados obtidos no nosso trabalho não apresentaram diferença estatística entre os grupos para a dosagem de proteínas totais. Por outro lado, a albumina sérica apresentou-se significativamente elevada no grupo de cadelas com câncer de mama sem metástase (grupo II- $T_{1,2,3}N_0M_0$) (média $3,30 \pm 0,68$; $p = 0,014$). Estes resultados poderiam ser explicados devido ao número amostral deste grupo ($n = 41$) ser maior em relação aos grupos I, III e IV (10, 9 e 8 respectivamente) pois, apesar do delineamento proposto permitir grupos não balanceados, um grupo maior aumentaria a diversidade amostral. Dessa forma a particularidade metabólica de cada animal, não sendo exata, muitas vezes pode se tornar um fator limitante para experimentos na área biológica.

Apesar disso, quando comparado os resultados encontrados para o grupo II com valores de referência estabelecidos para a espécie (2,3 a 3,8g/dL) (KANEKO, 1997) a média obtida não indica uma hiperalbuminemia. Divergindo de estudos que indicam hipoalbuminemia em pacientes portadores de câncer em estadio avançado (STEHELE *et al*, 1997), nossos dados não

apresentaram nenhuma diminuição sérica significativa para as cadelas portadoras de carcinoma mamário com metástases regionais ou à distância.

Os nossos resultados nos impulsionam a prosseguir os estudos direcionados a marcadores tumorais em carcinomas mamários na espécie canina. Todas as ferramentas capazes de auxiliar no diagnóstico precoce e monitoramento da doença são de extrema importância para determinar melhor um prognóstico para o paciente.

8- CONCLUSÃO

A partir das condições e dos dados obtidos nesta pesquisa pode-se concluir que:

- A concentração sérica do marcador tumoral mamário CA15.3 apresentou-se significativamente aumentada no grupo de cadelas com câncer de mama e metástase à distância ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_1$) quando comparado aos grupos de cadelas sem câncer de mama (T_0) e cadelas com câncer de mama sem metástase ($T_{1,2,3}N_0M_0$) .
- As concentrações séricas de CEA, fosfatase alcalina, LDH e proteínas totais não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos analisados.
- A concentração da enzima LDH apresentou uma tendência em elevar-se acompanhando a evolução da doença.
- A concentração sérica de albumina apresentou-se significativamente aumentada no grupo de cadelas com câncer de mama sem metástase ($T_{1,2,3}N_0M_0$) quando comparada aos grupos de cadelas sem câncer de mama (T_0), cadelas com câncer de mama e metástase regional ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_0$) e cadelas com câncer de mama e metástase à distância ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_1$).
- Não foi encontrada uma associação direta estatisticamente significativa entre as variações das concentrações sanguíneas de CEA e CA15.3 entre os grupos analisados.

9- CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Como se imagina, o ideal seria termos uma substância ou técnica suficientemente específica e sensível para detectar a existência de uma neoplasia no seu início, onde as chances de cura após o tratamento são altas. Dosagens de testes séricos são procedimentos pouco invasivos, relativamente práticos, financeiramente viáveis e possibilita o acompanhamento da paciente com a realização de coletas periódicas.

No presente trabalho, o achado mais importante observado foi a possível correlação entre o marcador tumoral sérico CA15.3 e o estadiamento do câncer de mama na cadela. Este fato confere mais uma semelhança entre neoplasias mamárias nas espécies canina e humana, onde os níveis séricos do marcador já é utilizado no acompanhamento de pacientes portadoras de carcinoma mamário.

No futuro, temos como propósito dar continuidade ao trabalho: acompanhar as pacientes com câncer de mama desde o momento pré- cirúrgico até um período de dois anos, com coletas periódicas relacionando sobrevida e tempo livre de doença com os marcadores séricos. Realizar uma análise mais detalhada da expressão destes marcadores diante da evolução tumoral, possibilitando a inserção destes testes para auxílio no diagnóstico e acompanhamento de câncer de mama em clínica veterinária.

10- REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.R.C. ; NUBIA DE LIMA PEDROSA, N.L ; LEITE, J.B. ;FLEMING, T.R.P. ; CARVALHO, V.H. ; CARDOSO A. A. A. Marcadores tumorais : Revisão da literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*. Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 305 – 316, 2007.
- ANDRIOLO, A. Marcadores tumorais bioquímicos circulantes. In: 1º Congresso Nacional de Saúde da Faculdade de medicina da UFMG, 2008. Faculdade de Medicina da UFMG. Disponível em:< <http://www.ufmg.br/congressodesaude/>> Acesso em: 01/09/2010.
- ANTUNES, M.I.P.P.; MORENO, K. Manejo da caquexia paraneoplásica em cães e gatos. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*. Umuarama, v. 12, n. 2, p. 157-162, Jul/Dez. 2009.
- AOYAMA, H.; SILVA, T.M.A; MIRANDA, M.A.; FERREIRA, C.V. Proteínas Tirosina Fosfatases: Propriedades e Funções Biológicas. *Química Nova*. v. 26, n. 6, p. 896- 900, 2003.
- ARAÚJO, L.H.L.; MELO, A.C.; MOREIRA, M.M.L. *et al* . Metástase Gástrica de Câncer de Mama: Relato de Caso e Revisão. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 53, n. 3, p. 365-368, 2007.
- ARGILÉS, J. M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. The role of cytokines in cancer cachexia. *Medicinal Research Review*. v. 19, n. 3, p. 223-48, May 1999.
- BALINT, E.; MANOLESCU, N.;BRASLASU, D.;LEAU, T.; DIACONESCU, A. Molecular detection through CEA(carcino-embrionic-antigen) of different types of cancer in animal. *Lucrări Stiintifice Medicină Veterinară*. Timioara, v. 51, p. 89- 93, 2008.
- BERGMAN, P.J. Mammary gland tumors. In: L.A.V. Conference (Ed.), The Latin American Veterinary Conference, Lima, Peru, 2007.
- CARVALHO, J. L. B. D. Nível sérico de desidrogenase láctica em doenças neoplásicas. *Pediatria*. São Paulo, v. 15, n. 3, p. 38- 40, 1993.
- CASSALI, G. D. *Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela - aspectos comparativos com neoplasias da mama humana*. 2000. 73p. Tese (Doutorado – Ciência Animal)- Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária, Belo Horizonte.
- CASSALI, G. *et al*. 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. 191-6, Jun 2007.
- CASSALI, G. D. Patologias da glândula mamária. In: NASCIMENTO, E.F. SANTOS, R.L.

Patologia da Reprodução dos animais domésticos. v. 2, n.2, 2003. p. 119 – 133.

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.

CAVALCANTI, M.F. *Fatores prognósticos na abordagem clínica e histopatológica dos carcinomas mamários de cadelas: estadiamento TNM e Sistema de Nottingham*. 2006 b. 105f Dissertação (Mestrado em Patologia)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CERON, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARTINEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*. v. 34, n. 2, p. 85-99, Jun. 2005.

CHARBONNEAU, J.; STANNERS, C. P. Role of carbohydrate structures in CEA-mediated intercellular adhesion. *Cell Communication and Adhesion*. v. 7, n. 3, p. 233- 244, 1999.

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.

COHEN, D.; REIF, J. S.; BRODEY, R. S. *et al*. Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer Research*. v. 34, p. 2859-2868, 1974.

CRIVELLARI, D.; PRICE, K.N.; HAGEN, M. *et al*. Routine tests during follow-up of patients after primary treatment for operable breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group (IBCSG). *Annals of Oncology*. v. 6, n. 8, p. 769-776, Oct. 1995.

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

DUFFY, M. *et al*. High preoperative CA 15-3 concentrations predict adverse outcome in node-negative and node-positive breast cancer: study of 600 patients with histologically confirmed breast cancer. *Clinical Chemistry*. v. 50, n. 3, p. 559-63, Mar 2004.

ECKERSALL, P. D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue de Médecine Vétérinaire*. v. 151, p. 577- 584, 2000.

FANTIN, V.; ST-PIERRE, J.; LEDER, P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*., v. 9, n. 6, p. 425-34, Jun. 2006.

FAUSTINO,A.M.R.; VAN GARDEREN, E.; SCHALKEN,J.A.; NEDERBRACKT,H. Tenascin expression in normal, hiperplastic, dysplastic and neoplastic canine mammary tissue. *Journal of Comparative Pathology*. v.126, n.1, p.1-8, 2002.

FERRI, S.T.S. Tumores mamários em fêmeas caninas e felinas: Revisão de literatura. *A Hora Veterinária*, ano 22, n. 131, p. 64- 67, 2003.

FUHRMAN, M.; CHARNEY, P.; MUELLER, C.M. Hepatic proteins and nutrition assessment. *Journal of the American Dietetic Association*. v. 104, n. 8, p. 1258-64, Aug. 2004.

GAMA, A.; PAREDES, J.; MILANEZI, M. F. et al. P-cadherin expression in canine lactating mammary gland. *Journal of Cellular Biochemistry*. v. 86, p. 420-421, 2002.

GILBERTSON, S. R; KURZMAN, I. D.; ZACHRAU, R. E. *et al.* Canine mammary epithelial neoplasm: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology*. v. 20, p. 127-142, 1983.

GION, M.; DAIDONE, M.G. Circulating biomarkers from tumour bulk to tumour machinery: promises and pitfalls. *European Journal of Cancer*. v. 40, p. 2613- 2622, 2004.

GOMES, C.; VOLL, J.; FERREIRA, K.C.R.S.; FERREIRA, R.R.; OLIVEIRA, L.O.; CONTESINI, E.A.; OLIVEIRA, R.T. Carcinoma inflamatório canino. *Acta Scientia e Veterinariae*, Rio Grande do Sul, v.34, n.2, p. 171- 174, 2006.

GRAHAM, J. C. & MYERS, R. K. The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 13, p. 416-418, 1999.

HARRIS, L.; FRITSCH, H.; MENNEL, R. *et al.* American Society of Clinical Oncology 2007: Update of recommendations for the use tumor markers in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. v. 25, n. 33, p.5287- 5312, 2007.

INCA. Exames Complementares no Diagnóstico do Câncer, Instituto Nacional do Câncer. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=50 > Acesso em: 18 Ago. 2010.

INUI A. Cancer anorexia- cachexia syndrome: are neuropeptides the key? *Cancer Research*, v. 59, p. 493- 501, 1999.

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

JOHNSTON, S. D. Reproductive systems. In: SLATTER, D. *Textbook of small animal surgery*. 2. ed. Philadelphia: Sanders, 1993. p. 2177-2192.

KANDIOLER-ECKERSBERGER, D.; LUDWIG, C.; MARGARETHE RUDAS, M. *et al.* TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*. v. 6, n. 1, p. 50-56, Jan 2000.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L.(ed.). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. 646-879p.

KAYSEN G.A. Why measure serum albumin levels? *Journal of Renal Nutrition*. v. 12, n. 3, p. 148- 150, 2002.

KHANNA, C.; LINDBLAD- TOH, K.; LONDON, C. *et al.* The dog as a cancer model. *Nature Biotechnology*. V. 24, n. 9, p. 1065- 1066, 2006.

KESHAVIAH, A.; DELLAPASQUA, S.; ROTMENSZ, N. *et al.* CA15-3 and alkaline phosphatase as predictors for breast cancer recurrence: a combined analysis of seven International Breast Cancer Study Group trials. *Annals of Oncology*. v. 18, n. 4, p. 701-708, Apr 2007.

KIRPENSTEIJN, J.; RUTTEMAN, G.R. Practical treatment of mammary neoplasia. In: North American Veterinary Conference, 2006, *Proceedings of the North American veterinary Conference*, Orlando, Flórida, v. 20, p. 799- 801, 2006.

KOSHIDA, K.; UCHIBAYASHI, T.; YAMAMOTO, H. *et al.* A potential use of a monoclonal antibody to placental alkaline phosphatase (PLAP) to detect lymph node metastases of seminoma. *Journal of Urology*. v. 155, n. 1, p. 337-41, Jan 1996.

KOUKOURAKIS, M.; KONTOMANOLIS, E.; [GIATROMANOLAKI, A.](#) *et al.* Serum and tissue LDH levels in patients with breast/gynaecological cancer and benign diseases. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. v. 67, n. 3, p. 162-8, 2009.

KURZMAN, I. D. & GILBERTSON, S. R. Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin. Veterinary Medicine Surgery. (Small Animal)*. v. 1, n. 1, p. 25-32, 1986.

LAS MULAS, J. M.; REYMUNDO, C. Animal models of human breast carcinoma: canine and feline neoplasms. *Reviews Oncology*. v. 2, n. 6, p. 274-281, nov/dez 2000.

LAVALLE, G.E. *Combinação de inibidores de COX-2 e Carboplatina no câncer de mama em cadela*. [Tese de Doutorado – Patologia Geral]. Universidade Federal de Minas Gerais - Faculdade de Medicina, Belo Horizonte; 2009.

LEBEAU, A. L'âge du chien et celui de l'homme essai de statistique sur la mortalité canine. *Bulletin de l'Academie Veterinaire*. v. 26, p. 229-232, 1953.

LEVENSON, V.V. Biomarkers for early detection of breast cancer: What, when, and where? *Biochimica et Biophysica Acta* n. 1770, p. 847- 856, 2007.

LINDBLOM, A.; LILJEGREN, A. Regular review: tumour markers in malignancies. *British Medical Journal*. v. 320, n. 7232, p. 424-427, Feb. 2000.

MAGRO, A.M.; BENTO, R.S. Marcadores tumorais. *Medicina Interna*. v. 4, n. 3, p. 189- 196, 1997.

MARCHESI, M.; CONTI, M.B.; PIERAMATI, C.; MANGILI, V.; FRUGANTIET, V.

Assessment and behavior of alphafetoprotein (AFP), antigen cancer 15/3 (CA 15/3), carcinoembryonal antigen (CEA) in clinical oncology of the dog: preliminary study. *Veterinary Research Communication*. v. 31 Suppl 1, p. 301-4, Aug 2007.

MIALOT, J. P. Patologia da mama. *Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos*. ed: A Hora Veterinária. cap. 11, p. 128-141, 1988.

MILLÁN, J.; FISHMAN, W. Biology of human alkaline phosphatases with special reference to cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. v. 32, n. 1, p. 1-39, 1995.

MISDORP, W. & HART, A. A. M. Canine mammary cancer. II. Therapy and causes of death. *Journal of Small Animal Practice*. v. 20, p. 395-404, 1979.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E. et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. 2nd Series. v. VII. Washington DC, *Arm. Forc. Inst. Pathol.* American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology. p. 1-59, 1999.

MISDORP, W. Malignant Mammary tumors in the dog and cat. In: MOUTON, D.J. *Tumors in Domestic Animals*. 4.ed. Iowa State press, 2002, p.589-606.

MOLINA, R. et al. Tumor markers in breast cancer- European Group on Tumor Markers recommendations. *Tumour Biology*, v. 26, n. 6, p. 281-93, 2005 Nov/Dec 2005.

MOTTA, V.T. Bioquímica Clínica para Laboratório - Princípios e Interpretações: Enzimas, v. 9. Porto Alegre: Médica Missau, 2000. p. 91- 120.

MOULTON, J. E. *Tumors in domestic animals*. 3 ed. Berkeley: University of California, 1990. p. 346- 369.

NAKAGE, A.; SANTANA, A.E.; de CAPULA, M.L.; GODOY, A.V. Characterization and quantification of blood cells from the umbilical cord of dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 34, n. 4, p. 394-6, Dec. 2005.

NICOLINI, A.; [TARTARELLI, G.](#); [CARPI, A.](#); [METELLI, M.R.](#); [FERRARI, P.](#); [ANSELMINI, L.](#); [CONTE, M.](#); [BERTI, P.](#); [MICCOLI, P.](#) Intensive post-operative follow-up of breast cancer patients with tumour markers: CEA, TPA or CA15.3 vs MCA and MCA-CA15.3 vs CEA-TPA-CA15.3 panel in the early detection of distant metastases. *BMC Cancer*. v. 6, p. 269, 2006.

NOVOSAD, C.A. Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 8, n. 2, p. 107- 109, 2003.

NOWAK, M.; NOSZCZYK- NOWAK, A.; SLAWUTA, P.; NOWACZYK, R.; POLANSKA, J. Metastasis of mammary carcinoma to myocardium in a dog: clinical and morphological correlation. *Bulletin of the Veterinary Institute Pulawy*. v.51, p. 313- 319, 2007.

OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. Paraneoplastic syndromes. In: TRENTON, N. J. Managing the

veterinary cancer patient: a practice manual. *Veterinary Learning Systems*, p. 197-222, 1995.

OGILVIE, G.; VAIL, D. Nutrition and cancer. Recent developments. *Veterinary Clinics North America: Small Animal Practice*. v. 20, n. 4, p. 969-85, Jul. 1990.

OLIVEIRA, J.T.; PINHO, S.S.; MATOS, A.J.; HESPANHOL, V.; REIS, C.A.; GARTNER, F. MUC1 expression in canine malignant mammary tumours and relationship to clinicopathological features. *The Veterinary Journal*. v. 182, p. 491-493, 2009.

OTA, D., FRAISER, P.; GUEVARA, J.; FOULKES, M. Plasma proteins as indices of response to nutritional therapy in cancer patients. *Journal Surgical Oncology*. v. 29, n. 3, p. 160- 165, Jul 1985.

OWEN, L. N. A comparative study of canine and human breast cancer. *Investigative Cell Pathology*. v. 2, p. 257-275, 1980.

PARK, B.W. *et al.* Preoperative Ca15-3 and CEA serum levels as predictor for breast cancer outcomes . *Journal of Oncology*, Oxford, v. 19, n. 4, p. 675-681, April 2008.

PATSIKAS, M. N. & DESSIRIS, A. The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part I: the 1st, 2nd, 4 th and 5 th mammary gland/ Part II: the 3 rd mammary gland. *Anatomy Histology & Embryology*. v. 25, Part I p. 131-138; Part II p. 139-143, 1996.

PELETEIRO, M.C. Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.89, p.10-34, 1994.

PEREZ-ALENZA, M. D.; PEÑA, L.; DEL CASTILLO, N. *et al.* Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. *Journal of Small Animal Practice*. v. 41, p. 287-291, 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*. v. 17, p. 102-106, 2003.

PRIER, J.; BRODEY, R. Canine neoplasia. A prototype for human cancer study. *Bull World Health Organ*. v. 29, p. 331-44, 1963.

PUCCIO, M.; NATHANSON, L. The cancer cachexia syndrome. *Seminars in Oncoogy*. v. 24, n. 3, p. 277-87, Jun. 1997.

QUEIROGA, F.; LOPES C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores de prognóstico. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. v. 97, n. 543, p. 2119-2127, 2002.

RAGUSO, C.; DUPERTUIS, Y.M.; PICHARD, C. The role of visceral proteins in the nutritional assessment of intensive care unit patients. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic*

Care. v. 6, n. 2, p. 211-6, Mar. 2003.

RAMOS, R.D.S.; MACHADO, L.H.A.; CONCEIÇÃO, L.C.; HECKLER, M.C.T. Estudo da prevalência das principais síndromes paraneoplásicas de 14 cães com linfoma- relato de casos. *Veterinária e Zootecnia*. v. 15. n. 3, p. 38- 39, 2008.

RIDGWAY, D. Lactic dehydrogenase and malignancy. *NY State Journal of Medicine*. v. 85, n. 12, p. 679-80, Dec. 1985.

ROTHSCHILD M.A., ORATZ M., SCHREIBER S.S. Extra vascular albumin. *The New England Journal of Medicine*. v. 301, n. 9, p. 497- 498, 1979.

SAFI, M.D.F.; KOHLER I.; HANS-GÜNTER, B. *et al.* The value of the tumor marker Ca15.3 in diagnosing and monitoring breast cancer: *Cancer*, Germany, v.68, Aug 1991.

SARLI, G.; PREZIOSI R.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; MARCATO, P.S. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. v. 14, n. 1, p. 25-34, Jan 2002.

SCHNEIDER, R. Comparison of Age, sex and incidence rates in human and canine. *Cancer*. v. 26, n. 2, p. 419-426, 1970.

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

SILVA, M.P.N. Síndrome da anorexia- caquexia em portadores de câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 52, n. 1, p. 59- 77, 2006.

SORENMO, K. ; KRISTIANSEN V.M.; COFONE, M.A.; SHOFR, F.S.; BREEN, A.M.; LANGE LAND, M.; MONGIL, C.M.; GRONDAHL, A.M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M.H. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary Comparative Oncology*. v. 7, n. 3, p. 162-72, Sep 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, Jan/Jun 2002.

STEHLE, G.; WUNDER, A.; SCHRENK, H. *et al.* Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself--implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, v. 26, n. 2, p. 77-100, Jul 1997.

STRANDBERG, J.; GOODMAN, D. Animal model of human disease: canine mammary neoplasia. *American Journal of Pathology*. v. 75, n. 1, p. 225-8, Apr 1974.

STRAW, R.C. Treatment of mammary gland tumors and perianal neoplasia. In N.A.V. Conference (Ed.), *Proceeding of the North American Veterinary Conference*, 2005, Orlando, Flórida, USA: North American Veterinary Conference, p. 672- 675.

TECLES, F.; CALDIN, M.; ZANELLA, A. *et al.* Serum acute phase protein concentrations in female dogs with mammary tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v. 21, n. 2, p. 214-9, Mar. 2009.

THURÓCZY, J.; [REISVAAG](#), G.J.K.; [PERGE](#), E. *et al.* Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *Journal comparative Pathology*. v. 137, n. 2-3, p. 122-9, Aug-Oct 2007.

VON KLEIST, S.; [MIGULE, I.](#); [HALLA, B.](#) Possible function of CEA as cell-contact inhibitory molecule. *Anticancer Research*, v. 15, n. 5B, p. 1889-94, Sep/Oct 1995.

WAISBERG J.; LANDMAN G.; CHA A.S.H.; HENRIQUES A.C.; GASPAR H.A.; SPERANZINI M.B. Padrão da distribuição tecidual do CEA no carcinoma colo-retal: relação com o nível sérico do CEA e classificação de Dukes. *Revista Brasileira de Coloproctologia*. v. 22, n. 1, p. 20- 26, 2002.

WINKLER, M.; GERRIOR, A.; POMP, A.P.; ALBINA, J.G. Use of retinol-binding protein and prealbumin as indicators of the response to nutrition therapy. *Journal of the American Dietetic Association*. v. 89, n. 5, p. 684-7, May 1989.

WU, S.; CHOU, F.; RAU, K. Clinical significance of a serum CA 15-3 surge and the usefulness of CA 15-3 kinetics in monitoring chemotherapy response in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research Treatment*, v. 124, n. 3, p. 879- 882, Aug 2010.

Apêndice 1: Artigo completo submetido à publicação:

Artigo submetido à revista Veterinary Comparative Oncology

**DETECTION OF POTENTIAL SERUM TUMOR MARKERS FOR
CANINE MAMMARY CANCER**

Liliane Cunha Campos¹, Gleidice Eunice Lavalley², Alessandra Estrela-Lima³, Joyce Costa Melgaço de Faria¹, Álvaro Pimenta Dutra⁵, José Eugênio Guimarães³, Enio Ferreira⁵ Giovanni Dantas Cassali^{1*}

¹ Instituto de Ciências Biológicas- UFMG- Belo Horizonte- MG - Brazil

² Escola de Veterinária/ Hospital Veterinário - UFMG- Belo Horizonte- MG- Brazil

³ Escola de Medicina Veterinária/ Hospital Veterinário - UFBA- Salvador- Bahia- Brazil

⁴ Hospital da Clínicas da UFMG- Belo Horizonte- MG- Brazil

⁵ Departamento de Medicina Veterinária- UFLA- MG- Brazil

*Correspondência:

Laboratório de Patologia Comparada – Departamento de Patologia Geral – ICB/UFMG

Caixa Postal 486 31270-901 – Belo Horizonte, MG - Brasil

e-mail: cassalig@icb.ufmg.br



Detection of potential serum tumor markers for canine mammary cancer

Journal:	<i>Veterinary and Comparative Oncology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Campos, Liliame; UFMG, Laboratory of Comparative Pathology - Department of General Pathology - ICB/UFMG Lavalle, Gleidice; UFMG, Veterinary Hospital - EV Estrela-Lima, Alessandra; UFBA, Veterinary Hospital- EMV Faria, Joyce; UFMG, Laboratory of Comparative Pathology - Department of General Pathology - ICB Dutra, Álvaro; Hospital da Baleia Guimarães, José Eugênio; UFBA, Veterinary Hospital- EMV Ferreira, Enio; UFLA, Department of Veterinary Medicine Cassali, Giovanni; Universidade Federal de Minas Gerais, Patologia Geral; Universidade Federal de Minas Gerais, Patologia Geral
Keywords:	cancer, mammary gland, Metastasis, tumor marker, female dog

Abstract

Serum tumor markers can assist in determining prognosis and detecting breast cancer recurrence in women. The aim of this study was to determine and evaluate the serum concentrations of CEA, CA15.3, LDH and alkaline phosphatase in female dogs with different stages of mammary cancer. We evaluated 67 female dogs, including 10 that were healthy, 40 that had non-metastatic cancer, 9 with regional metastasis and 8 with distant lymph node metastasis. A direct relationship between increased CA15.3 and LDH serum levels and the presence of regional and distant lymph nodes metastases was observed. However, compared with animals without metastasis, a significant increase in serum CA15.3 levels was only observed in the distant lymph node metastasis group. CEA and alkaline phosphatase showed no significant change among the groups. According to these findings, the evaluation of serum markers CA15.3 and LDH in female dogs with advanced stage mammary cancer can assist in early metastases detection, in prognosis determination and in monitoring the treatment of these animals.

Keywords: cancer, mammary gland, female dog, tumor marker

Introduction

Molecules that are associated with the presence of cancer have been extensively investigated and used in clinical practice for over 30 years ¹. Tumor markers are mostly normal cellular metabolism products that show increased production due to malignant transformation ².

These markers indicate malignancy and are characterized by substances present in the tumor, blood or other fluids that are primarily produced by the tumor or secondarily in response to the presence of tumor ³.

In human medicine, the ASCO (American Society of Clinical Oncology) ⁴ and EGTM (European Group on Tumor Markers) ⁵ recommend the evaluation of serum changes of CEA (carcinoembryonic antigen) and CA15.3 (carcinoma antigen 15.3) to assist in the prognostic evaluation and treatment monitoring of women with breast cancer.

CEA is a glycoprotein with a molecular weight of 180 kDa ⁶ that is produced by normal cells of the gastrointestinal mucosa ⁷ and is mainly overexpressed by colon, rectum, breast and lung adenocarcinomas. It is involved in intercellular adhesion, ^{6, 8} and its serum concentration is elevated in 30 to 50% of patients with metastatic breast cancer ^{4, 9}.

CA15.3 is a high-molecular-weight mucin glycoprotein ⁶ that is related to cell adhesion ¹⁰. This molecule is considered the most indicative serum tumor marker for female breast cancer because its concentration is elevated in 54 to 80% of the patients with metastatic breast cancer ⁹.

The serum levels of enzymes such as alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase (LDH) can also assist in monitoring the evolution of an already diagnosed tumor. However, these enzymes are considered low specificity tumor markers because they may be elevated in non-neoplastic diseases ¹¹.

Spontaneous tumors of the mammary gland are the most frequent type of neoplasia in female

dogs^{12, 13, 14, 15}. These lesions have attracted great interest due to the increasing number of malignant tumors in this species, mainly due to delayed diagnosis, which undermines treatment and reduces the survival rate of animals, similar to human breast cancer^{15, 16}.

The identification of markers that could predict tumor behavior is especially important for mammary cancer, mainly due to the variability in clinical disease progression. These markers can be useful in the clinical management of cancer patients, for example, by assisting in diagnostic procedures, staging, treatment response evaluation, recurrence detection and prognosis, and the development of new methods of treatment⁷.

Thus far, there are no immunoassay reagents specific to dog female mammary cancer, and focused on serum tumor markers in the veterinary clinic are also scarce. The use of such markers would be an additional tool for the treatment and early diagnosis of canine mammary cancer, as has been used in human medicine. In addition, although serum tests are relatively inexpensive compared with immunohistochemical tests, which are used in veterinary medicine, they have still a high cost.

In this context, this study aimed to compare the serum concentrations of CEA, CA15.3, alkaline phosphatase and LDH in healthy female dogs and female dogs with mammary cancer, with and without lymph node metastasis.

Material and Methods

The study was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee (CETEA/UFGM), protocol no. 258/08.

A total of 67 female dogs were randomly selected and used without breed preference. Each dog was at least six years old and was admitted at the Veterinary Hospital from the Veterinary School of the Federal University of Minas Gerais (UFGM) or the Veterinary Hospital from the Veterinary Medical School from the Federal University of Bahia (UFBA). After clinical

evaluation the animals were subdivided into four groups according to the following criteria:

Group I (T_0) – Female dogs with no mammary cancer: 10 female dogs that had undergone ovarian hysterectomy or routine examination were selected and showed no evidence of mammary neoplasia;

Group II ($T_{1,2,3}N_0M_0$) – Female dogs with mammary cancer without regional or distant lymph node metastasis. Forty female dogs that had undergone tumor excision surgery and had a histopathological diagnosis of malignant epithelial mammary neoplasia (regardless of tumor type) but with no evidence of metastasis in regional lymph nodes (axillary and inguinal), non-regional lymph nodes or the chest radiographic examination;

Group III ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_0$) – Female dogs with mammary cancer and regional metastasis. Nine female dogs that had undergone tumor excision surgery and had a histopathological diagnosis of malignant epithelial mammary neoplasia (regardless of tumor type) and evidence of regional lymph node(s) metastasis (axillary and inguinal) but without evidence of metastasis in non-regional lymph nodes or in the chest radiographic examination;

Group IV ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_1$) – Female dogs with mammary cancer and distant metastasis. Eight female dogs that had undergone tumor excision surgery and had a histopathological diagnosis of malignant epithelial mammary neoplasia (regardless of tumor type), with evidence of non-regional lymph node(s) metastasis but without evidence of metastasis in the chest radiographic examination.

All the histopathological diagnoses were done by veterinarians and pathologists from the Comparative Pathology Laboratory from the Department of General Pathology of the UFMG Institute of Biological Sciences (LPC/ ICB/ UFMG). The criteria used for lesion diagnoses were proposed by Misdorp et al. ¹⁷.

Blood samples were collected using vacuum collection system (Vacutainer[®]) in 10 mL plastic tubes containing separating gel and no anticoagulant. After collection and clot retraction, the material was centrifuged at 3,000 rpm for 5 minutes, and the serum was subjected to LDH and alkaline phosphatase enzymatic assay on the same day of collection and frozen at -20°C to

perform the CEA and CA15.3 assays after the histopathological diagnoses were known.

The serum tests were done according to the protocol of each manufacturer. Together with the whole battery of assays, a control serum (supplied with the kit) was measured with a known concentration range. The reagents used were the same as those used for human diagnostics.

The LDH tests were performed using the continuous ultraviolet kinetic method, and the alkaline phosphatase tests were conducted by a kinetic-colorimetric (modified Roy) method. The commercial kit used in the experiment was the Analisa Gold[®], and the Labmax 240[®] (Labtest Diagnóstica) was used for reaction readings. The results were expressed in U/L and compared to reference values established for the canine species: LDH (45 to 233 U/L) and alkaline phosphatase (20 to 156 U/L)¹⁸.

To test for CEA and CA15.3, commercial solid phase, non-competitive ELISA immunoassay kits were used (both from CanAg – Fujirebio[®] Diagnostics, Inc.). The Labmax 240[®] (Labtest Diagnóstica) was used for measurements. The CEA results were expressed in ng/mL, and CA15.3 was expressed in U/mL. For both tests, no reference values had been established for veterinary medicine.

The proposed experimental design was completely randomized with four treatments and four groups with 10, 41, 9 and 9 replicates, respectively, with each animal being a replicate. The D'Agostino & Pearson omnibus normality test was used to evaluate the normality of the experiment, and the analysis of variance (ANOVA) was analyzed using the statistical software GrapPad InStat v. 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA) followed by Student-Newman-Keuls (SNK) and Tukey's tests (CEA determinations were analyzed after logarithmic transformation before testing). In the same way, possible correlations were investigated by Pearson or Spearman tests. Associations and concordance were considered significant when the test significance probability had $p < 0.05$.

Results

Among the diagnosed tumors, the most frequent type was mixed tumor carcinoma (29/57; 50.87%), followed by carcinoma *in situ* and tubular carcinoma (both 6/57; 10.52% (Table 1). The age of the affected animals at the time of surgery ranged from 6 to 15 years old (mean, 10 ± 2.3 years old), while the group of female dogs that had no mammary neoplasia ranged from 4 to 11 years old (mean 6 ± 2 years old).

Breeds were not used as selection criteria, but a greater frequency of the Poodle breed (28/57; 41.7%) was observed, followed by unknown breed animals (13/57; 19.40%). The eight female dogs from group IV ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_1$) showed non-regional lymph node metastases with no cases of lung or liver metastasis.

The serum concentration of CA15.3 was significantly higher in group IV ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_1$) compared with groups I (T_0) ($p = 0.0029$) and II ($T_{1,2,3}N_0M_0$) ($p = 0.0095$), while groups I (T_0), II ($T_{1,2,3}N_0M_0$) and III ($T_{1,2,3}N_{1,2}M_0$) had no statistically significant differences among each other ($p > 0.05$; Table 2). However, we observed a moderately positive ($r=0.402$) and significant relationship ($p = 0.001$) between the marker serum concentration and the disease staging (Figure 1).

The CEA test did not show a normal distribution, thus, it was log-transformed and further analyzed statistically, showing no significant difference between groups (Tukey's test: $p > 0.05$; Table 2).

The increase in serum CEA and CA15.3 showed a positive correlation, although it was only a weak, statistically insignificant relationship ($r = 0.066$; $p = 0.588$).

As shown in Figure 3, the alkaline phosphatase and LDH serum tests showed no statistically significant differences among the groups analyzed (NKS test: $p > 0.05$). However, there was a positive ($r=0.263$) and significant relationship ($p = 0.032$) between increased serum LDH and

staging progression of the disease, as observed in the Figure 2.

Discussion

The biopathology of canine mammary tumors concerns the overall scientific community because these tumors have been proposed as a comparative model for the study of human female breast cancer. These comparative studies are feasible due to the epidemiological and biological similarities of mammary tumors in both species ¹³.

Additionally, there is a great interest in veterinary medicine to achieve better monitoring of tumor development and response to therapy, aiming to increase survival rates and disease-free intervals and prioritizing the quality of life for the animal.

The assessment of some serological tests can assist in the evaluation of neoplasia development, enable the detection of metastasis and recurrences ¹⁹ and be useful for evaluating disease progression following treatment ⁴.

Tumor markers may be quantified or characterized by biochemistry and immunohistochemistry in tissues or blood, in addition to genetic tests in search of oncogenes, tumor suppressor genes and genetic alterations ⁷.

The serum tumor marker CA15.3 has been broadly studied in human medicine since the 1980s; however, in veterinary medicine, there are few references about tumor markers in the literature. In the present study, the results demonstrated a significant difference in the CA15.3 concentrations of groups I (T₀) and IV (T_{1,2,3}N_{1,2}M₁; p = 0.0095) and groups II (T_{1,2,3}N₀M₀) and IV (T_{1,2,3}N_{1,2}M₁; p= 0.0029), suggesting that the increased blood concentration of the marker is proportional to the clinical stage of the disease. This finding agrees with Almeida et al., ⁷ who affirmed that, in human medicine, serum CA15.3 varies according to the cancer staging of the patient and increases 5% to 30% from the normal values in stage I, 15% to 50% in stage II, 60 to 70% in stage III, and 65 to 90% in stage IV. Moreover, it is well known that, in humans, very high serum levels are associated

with poor survival.

Marchesi et al.²⁰ performed a study aiming to establish a method for CA15.3 testing in the veterinary clinic and obtained a mean serum level of 2.77 ± 0.28 for the marker in dogs without neoplastic disease. This result differs from the data obtained in our study, where in healthy female dogs, the mean serum level of CA15.3 was 1.37 ± 0.46 . This difference may have occurred mainly due to different ELISA methodologies used and the use of different reagents.

The role of the CEA tumor marker in neoplastic diseases of animals was studied by Balint et al.²¹, who measured the marker in serum and observed a significant increase in its level in animals with neoplasia. However, in this study, the groups compared were heterogeneous in relation to sex, species (feline and canine), histopathological diagnosis and clinical staging. In our study evaluating only female dog mammary neoplasias, there were no statistically significant differences between the groups.

It should be considered that levels of serum CEA are influenced by the rate and amount of its production by carcinoma cells, the existence of tumor necrosis and perivascular infiltration. Other factors that may influence the determination of serum CEA levels are the hepatic metabolism and the renal elimination rate²².

Another important result was the stronger relationship between the increase in CA15.3 serum levels and the disease staging compared with the increased CEA serum levels. These data suggest the possibility of using CA15.3 as a tumor marker, which is in agreement with Shawn et al.²³, who conducted a study aiming to compare four serum tumor markers, among them CEA and CA15.3, for the detection of breast cancer in women. They concluded that the CA15.3 tumor marker had the best performance regarding diagnosis and monitoring of tumor evolution due to its higher sensitivity compared with other markers.

The LDH levels showed a positive and significant relationship with tumor staging and disease evolution. These data agree with the statement of Magro and Bento¹¹, who state that the

bloodstream concentration of this enzyme is increased with disease evolution, indicating a poorer prognosis. Moreover, Carvalho ²⁴ affirmed that neoplastic cells observed experimentally have an increased glycolysis rate and proposed an increase in LDH activity. Despite this important observation, the enzyme demonstrated no statistically significant differences between the groups analyzed here.

Keshaviah et al. ²⁵ affirmed that the enzyme alkaline phosphatase would be a better marker in cases with liver or bone metastases. In women with breast cancer, one of the main sites of metastasis is the bones ²⁶, yet in female dogs, this occurrence is rare ²⁷. In accordance with these data, our study showed no patients with bone metastases. This might have influenced the results in which there were no statistical differences in the enzyme between groups ($p > 0.05$).

In conclusion, this study observed an association between the presence of advanced mammary cancer in female dogs (with non-regional lymph node metastasis) and the increase in serum CA15.3 levels, suggesting a possible use of this protein as a serum tumor marker. Measurement of this tumor marker would be of great value to the veterinary clinic for monitoring disease progression and the response to chemotherapy.

Acknowledgements

This study was supported, in part, by Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- 1- Gion M, Daidone MG. Circulating biomarkers from tumour bulk to tumour machinery: promises and pitfalls. *European Journal of Cancer* 2004; 40: 2613- 2622.
- 2- Eisenberg ALA, Koifman S. Câncer de mama: Marcadores tumorais. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2001; 47(4): 377- 388.
- 3- Jacobs, EL, Haskell MC. Clinical use of tumor markers in oncology. *Current Problems in Cancer* 1991; 15 (6): 299-360.
- 4- Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC. American Society of Clinical Oncology 2007: Update of recommendations for the use tumor markers in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2007; 25(33): 5287- 5312.
- 5- Molina R, Barak V, Dalen A, Duffy MJ, Einarsson R, Gion M, Goike H, Lamerz H, Nap M, Sölétormos G, Stieber P. Tumor markers in breast cancer- European Group on Tumor Markers recommendations. *Tumour Biology* 2005; 26 (6): 281-93.
- 6- Souza JV. Marcadores mucinosos associados ao câncer. *Revista da Associação médica do Rio Grande do Sul* 2002; 46: 70- 83.
- 7- Almeida JRC, Pedrosa NL, Leite JB, Fleming TRP, Carvalho VH, Cardoso AA. Marcadores tumorais : Revisão da literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007; 53(3): 305 – 316.
- 8- von Kleist S, Migule I and Halla B. Possible function of CEA as cell-contact inhibitory molecule. *Anticancer Research* 1995; 15(5B): 1889-1894.
- 9- Cheung KL, Graves CRL, Robertson JFR. Tumour marker measurements in the diagnostics and monitoring of breast cancer. *Cancer Treatment Reviews* 2000; 26:91- 102.
- 10- Duffy M, Duggan C, Keane R, Hill A, McDermott E, Crown J, et al. High preoperative CA 15-3 concentrations predict adverse outcome in node-negative and node-positive breast cancer: study of 600 patients with histologically confirmed breast cancer. *Clinical Chemistry* 2004; 50(3): 559-63.
- 11- Magro AM and Bento RS. Marcadores tumorais. *Medicina Interna* 1997; 4 (3): 189- 196.
- 12- Peleteiro MC. Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 1994; 89:10-34.
- 13- Cassali GD. *Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela - aspectos comparativos com neoplasias da mama humana*. 2000. 73p. Tese (Doutorado – Ciência Animal)- Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária, Belo Horizonte.

- 14- Misdorp W. Malignant Mammary tumors in the dog and cat. In: Mouton, DJ. *Tumors in Domestic Animals*. 4.ed. Iowa State Press, 2002: 589-606.
- 15- Cavalcanti MF and Cassali GD. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas- revisão. *Revista Clínica Veterinária* 2006; XI (61): 56- 63.
- 16- Silva AE, Serakides R, Cassali GD. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Ciência Rural* 2004; 34(2): 625- 633.
- 17- Misdorp, W.; Else, R.W.; Hellmén, E. Limpscomb, T.P. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. *World Health Organization*. Washington D.C., 1999; (7):11-25.
- 18- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997: 646-879.
- 19- Safi F, Kohler I, Rottinger E, Beger HG. The value of the tumor marker CA15.3 in Diagnosing and monitoring breast cancer. *Cancer*, 1991:574- 582.
- 20- Marchesi M, Conti M, Pieramati C, Mangili V, Fruganti G. Assessment and behavior of alphafetoprotein (AFP), antigen cancer 15/3 (CA 15/3), carcinoembryonal antigen (CEA) in clinical oncology of the dog: preliminary study. *Veterinary Research Communication* 2007;31(1): 301-304.
- 21- Balint E, Manolescu N, Braslasu D, Leau T, Diaconescu A. Molecular detection through CEA(carcino-embryonic-antigen) of different types of cancer in animal. *Lucrări Stiintifice Medicină Veterinară* 2008; 51: 89- 93.
- 22- Waisberg J, Landman G, Cha ASH, Henriques AC, Gaspar HA, Speranzini MB. Padrão da distribuição tecidual do CEA no carcinoma colo-retal: relação com o nível sérico do CEA e classificação de Dukes. *Revista Brasileira de Coloproctologia* 2002; 22 (1): 20- 26.
- 23- Shawn RC, Kevin LB, Bryant SA, James TJ, Jackson M, Wilson C, Holifield K, Vincent C, Hall M. Comparative Study of Four Serological Tumor Markers for the Detection of Breast Cancer. *Journal of the Mississippi Academy of Sciences* 2002; 47(2): 126- 128.
- 24- Carvalho JLBD. Nível sérico de desidrogenase láctica em doenças neoplásicas. *Pediatrics* 1993; 15(3): 38- 40.
- 25- Keshaviah A, Dellapasqua S, Rotmensz N, Lindtner J, Crivellari D, Collins J, et al. CA15-3 and alkaline phosphatase as predictors for breast cancer recurrence: a combined analysis of seven International Breast Cancer Study Group trials. *Annals of Oncology* 2007; 18(4): 701-708.
- 26- Araujo LHL, Melo AC, Moreira MML, Gomes CAS, Júnior HN, Cunha WML, Gauí MFD. Metástase Gástrica de Câncer de Mama: Relato de Caso e Revisão. *Revista Brasileira de*

Cancerologia 2007; 53(3): 365-368.

27- Nowak M, Noszczyk- Nowak A, Slawuta P, Nowaczyk R, Polanska J. Metastasis of mammary carcinoma to myocardium in a dog: clinical and morphological correlation. *Bulletin of the Veterinary Institute Pulawy* 2007; 51: 313- 319.

Appendix 1- List of figures and tables

Table 1: Frequency of breast tumor histological types in the female dogs in study (n= 57)

Diagnosis	Frequency	%
Carcinosarcoma	1	1.70
Mixed Tumor carcinoma	29	50.87
Carcinoma <i>in situ</i>	6	10.52
Tubular carcinoma	6	10.52
Tubulo-papillary carcinoma	5	8.77
Papillary carcinoma	2	3.50
Micropapillary carcinoma	2	3.50
Solid carcinoma	2	3.50
Solid tubular carcinoma	3	5.26
Secretory carcinoma	1	1.75
Total	57	100.0

Table 2. Mean and standard deviation of CEA and CA15.3 serum levels in female dogs from groups I, II, III and IV.

Group (n)	CEA (ng/mL)	CA15.3 (ng/mL)
Group I (10)	0.08± 0.04 (a)	1.37± 0.46 (a)
Group II (41)	0.12± 0.12 (a)	1.62± 0.60 (a)
Group III (9)	0.11± 0.13 (a)	2.01± 0.79 (ab)
Group IV (9)	0.07± 0.04 (a)	2.59± 1.02 (b)

The means followed by different letters in the same column differ statistically with p-value < 0.05. Group I: female dogs without mammary cancer; group II: female dogs with mammary cancer without metastasis; group III: female dogs with regional metastasis; group IV: female dogs with distant metastasis.

Table 3: Mean and standard deviation of alkaline phosphatase and LDH serum levels in female dogs from groups I, II, III and IV.

Group (n)	Alkaline phosphatase (U/L)	LDH (U/L)
Group I (10)	92.5 ± 53.96 (a)	236.9 ± 112.1 (a)
Group II (40)	77.48 ± 46.12 (a)	282.1 ± 163.9 (a)
Group III (9)	117.8 ± 85.57 (a)	384.4 ± 268.6 (a)
Group IV (8)	77.1 ± 36.40 (a)	414.0 ± 178.8 (a)

The means followed by identical letters in the same column do not differ statistically with p-value<0.05. Group I: female dogs without mammary cancer; group II: female dogs with mammary cancer without metastasis; group III: female dogs with regional metastasis; group IV: female dogs with distant metastasis.

Figure 1

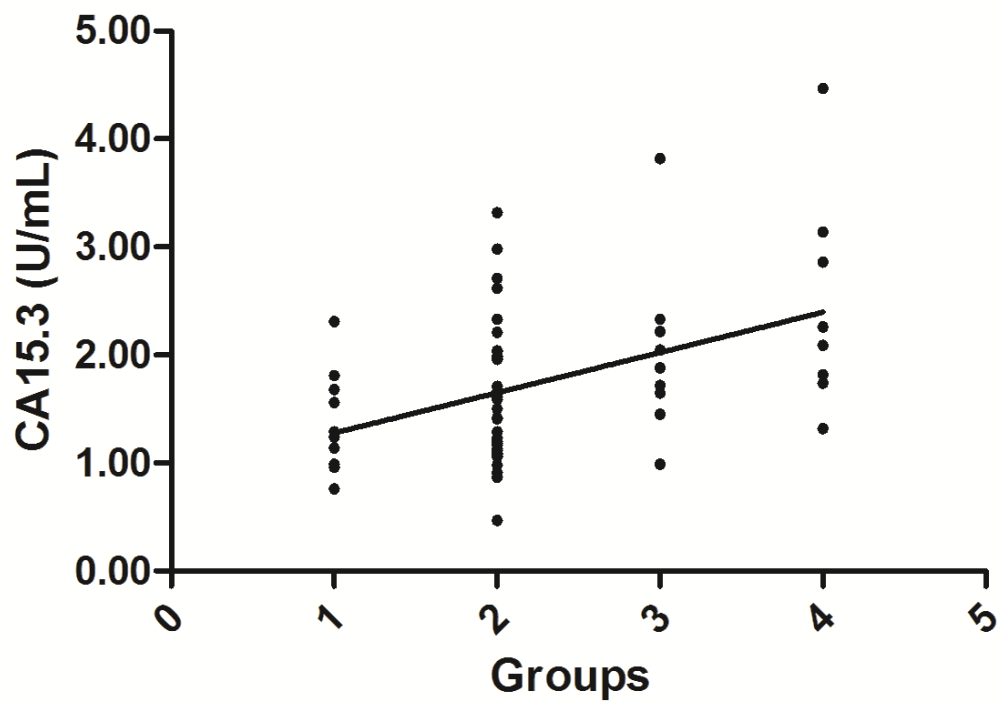
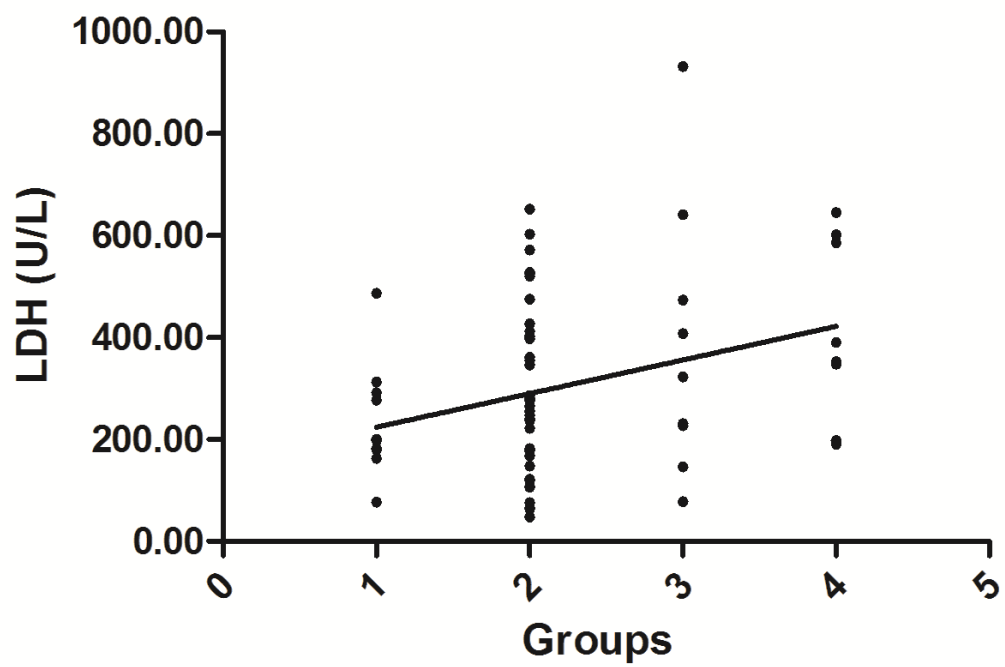


Figure 2



Appendix 2- Figure Legends

Figure 1: Positive correlation ($r= 0,402$; $p= 0,001$) between serum concentration of CA15.3 and staging of groups. 1. Female dogs without mammary cancer ($n=10$, 1.37 ± 0.46). 2. Female dogs with mammary cancer without metastasis ($n= 40$, 1.62 ± 0.60). 3. Female dogs with regional metastasis ($n=9$, 2.01 ± 0.79)..4. Female dogs with distant metastasis ($n=8$, 2.59 ± 1.02).

Figure 2: Positive correlation ($r= 0,263$; $p= 0,032$) between serum concentration of LDH and staging of groups.. 1. Female dogs without mammary cancer ($n=10$, 236.9 ± 112.1). 2. Female dogs with mammary cancer without metastasis ($n= 40$, 282.1 ± 163.9). 3. Female dogs with regional metastasis ($n=9$, 384.4 ± 268.6). 4. Female dogs with distant metastasis ($n=8$, 414.0 ± 178.8).

Apêndice 2 – Produção científica relacionada à dissertação

1. Trabalhos apresentados em congressos

XIV ENAPAVE 12 a 16 de outubro de 2009

- CAMPOS, L. C. ; CASSALI,G.D. ; LAVALLE, G.E. . Carcinossarcoma de mama em cadela: perfil sorológico e hematológico. 2009.
- CAMPOS, L. C. ; CASSALI,G.D. ; LAVALLE, G.E. . carcinoma inflamatório de mama em cadelas: perfil sorológico e hematológico. 2009.

VI ONCOVET 29 de Abril a 02 de Maio de 2010

- LAVALLE, G.E. ; CAMPOS, L. C. ; CASSALI,G.D. ; FARIA, J.C.M. ; DUTRA, A.P. . Avaliação de marcadores tumorais sorológicos na espécie canina como proposta de estudo em oncologia mamária: relato de caso. 2010.

2. Artigos publicados em periódicos

- CAMPOS, L.C.; LAVALLE, G.E.; CARNEIRO, R.A.; DUTRA, A.P.; VIANA, A.A.S.; CASSALI, G.D. Carboplatina e inibidor de COX-2 no tratamento do carcinoma inflamatório de mama em cadela: relato de caso. *Clínica Veterinária*, ano XVI, v.92, p. 72- 76, 2011.
- CAMPOS, L. C. ; GAMBA, C.O. ; LAVALLE, G.E. ; CASSALI,G.D. . CEA como marcador tumoral em cadela portadora de carcinossarcoma mamário avançado. *Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação- MEDVEP*, v. 8, n.27, Curitiba: Medveo, p.646- 649, 2010.

Apêndice 3- Produção científica não relacionada à dissertação

1. Trabalho apresentado em congresso

Simpósio Mineiro de Oncologia e 12^o Encontro dos ex-residentes do CEOMG 14 a 17 de Abril 2010

- REIS, D.C. ; CAMPOS, L. C. ; SOUZA, C.M. ; FERREIRA, E. ; CASSALI, G.D. . Uso da talidomida em oncologia mamária: avaliação hematológica em animais portadores do tumor mamário experimental 4T1. In: Simpósio Mineiro de Oncologia, 2010, Belo Horizonte. Revista Oficial Anais de Evento - tema: A importância do tratamento sistêmico. São Paulo: Office editora e publicidade, 2010. p. 50-50.

2. Trabalho apresentado em seminários

VIII UNIFENAS rural 22 a 26 de Março de 2010

- FORCELA, A.K.C. ; CAMPOS, L.C. ; CAMPOS, L. C. ; HANEMANN, J.A.C. . Paracoccidiodomicose. In: VIII seminário UNIFENAS rural, 2010, Alfenas. VIII seminário UNIFENAS rural- Anais: Inovação tecnológica. Alfenas : Arte Grafica Atenas, 2010. p. 80.

- FORCELA, A.K.C. ; CAMPOS, L.C. ; CAMPOS, L. C. ; HANEMANN, J.A.C. . Câncer labial. In: VIII Seminário UNIFENAS Rural, 2010, Alfenas. VIII seminário UNIFENAS rural- Anais: Inovação tecnológica. Alfenas : Arte grafica Atenas, 2010. p. 37.

12. ANEXOS

Anexo 1- Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 258/2008**, relativo ao projeto intitulado **"Avaliação dos marcadores sorológicos tumorais em cadelas com e sem metástase de câncer de mama"**, que tem como responsável(is) **Geovanni Dantas Cassali**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFGM)**, tendo sido aprovado na reunião de **11/ 02/2009**.

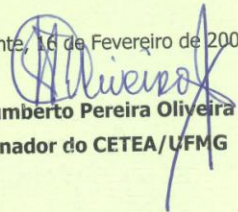
Este certificado expira-se em **11/ 02/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 258/2008**, related to the project entitled **"Evaluation of sorological tumoral markers in female dogs with and without metastasis of mammary cancer"**, under the supervisors of **Geovanni Dantas Cassali**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFGM)**, and was approved in **February 11, 2009**.

This certificate expires in **February 11, 2014**.

Belo Horizonte, 16 de Fevereiro de 2009.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFGM

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

Anexo 2- Aprovação de artigo para publicação



Curitiba, 05/12/2010

Liliane C. Campos, Gleidice E. Lavallo, Conrado de O. Gamba, Giovanni D. Cassali

Ref.: Aprovação de artigo para publicação

Prezados Drs.:

Informamos que o artigo **PROPOSTA DE UTILIZAÇÃO DA DOSAGEM DE CEA COMO MARCADOR TUMORAL EM CADELA PORTADORA DE CARCINOSSARCOMA MAMÁRIO AVANÇADO** encaminhado ao Corpo Científico recebeu parecer favorável para publicação na revista **MEDVEP**, em espaço e data a serem definidos conforme critérios editoriais.

Agradecemos a deferência pela escolha de nossa Editora para envio de seu trabalho, ressaltando que nos sentiremos honrados em receber outros artigos, para futuras publicações.

Atenciosamente,

Marilene C Bloot
Edição
edicao@medvep.com.br

Anexo 3- Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas de mama da cadela (Owen,1980)

Tumor Primário (T)

T0 Tumor não detectável

T1 Tumor < 3 cm

a : não fixo

b : fixo à Pele

c : fixo ao Músculo

T2 Tumor de 3 – 5 cm

a : não fixo

b : fixo à Pele

c : fixo ao Músculo

T3 Tumor > 5 cm

a : não fixo

b : fixo à Pele

c : fixo ao músculo

T4 Tumor de qualquer tamanho (Carcinoma inflamatório)

Linfonodos Regionais (N)

N0 Sem evidência de linfonodo regional (axilares ou inguinais)

N1 Linfonodo Ipsilateral envolvido

a : não fixo

b : fixo

N2 Linfonodos bilaterais envolvidos

a : não fixo

b : fixo

Metástases à Distância (M)

M0 Sem evidência de metástase distante

M1 Metástase distante incluindo linfonodos não-regionais