



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PESQUISA DE CÉLULAS TUMORAIS DISSEMINADAS EM MEDULA ÓSSEA,
ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM CADELAS COM NEOPLASIA
MAMÁRIA EM ESTADIAMENTO CLÍNICO AVANÇADO.**

BELO HORIZONTE

2018

Miriã Rodrigues de Oliveira

**PESQUISA DE CÉLULAS TUMORAIS DISSEMINADAS EM MEDULA ÓSSEA,
ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE CADELAS COM
NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM ESTADIAMENTO CLÍNICO AVANÇADO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre – área de concentração em Patologia Investigativa.

Orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

Co-orientadora: Dra. Gleidice Eunice Lavalle

BELO HORIZONTE

2018

OL48p Oliveira, Miriã Rodrigues de.
Pesquisa de células tumorais disseminadas em medula óssea, alterações hematológicas e bioquímicas de cadelas com Neoplasias Mamárias em estadiamento clínico avançado [manuscrito]. / Miriã Rodrigues de Oliveira. - - Belo Horizonte: 2018.
76f.: il.
Orientador (a): Geovanni Dantas Cassali.
Coorientador (a): Gleidice Eunice Lavalle.
Área de concentração: Patologia Investigativa.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias Mamárias Animais. 2. Células Neoplásicas Circulantes. 3. Neoplasias Hematológicas. 4. Doenças Hematológicas. 5. Bioquímica. 6. Dissertação Acadêmica. I. Cassali, Geovanni Dantas. II. Lavalle, Gleidice Eunice. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QZ 203

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA MIRIÃ RODRIGUES DE OLIVEIRA

Realizou-se, no dia 23 de fevereiro de 2018, às 14:00 horas, ICB, bloco C3, sala 241, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *CÉLULAS TUMORAIS DISSEMINADAS (CTDS) EM MEDULA ÓSSEA, ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM ESTADIAMENTO CLÍNICO AVANÇADO*, apresentada por MIRIÃ RODRIGUES DE OLIVEIRA, número de registro 2016662845, graduada no curso de MEDICINA VETERINÁRIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Geovanni Dantas Cassali - Orientador (UFMG), Dra. Gleidice Eunice Lavalle – Coorientadora (UFMG), Profa. Fabiola de Oliveira Paes Leme (Universidade Federal de Minas Gerais), Dra. Débora Balabram (SCM-BH).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2018.

Prof. Geovanni Dantas Cassali (Doutor)

Dra. Gleidice Eunice Lavalle (Doutora)

Profa. Fabiola de Oliveira Paes Leme (Doutora)

Dra. Débora Balabram (Doutora)

DEDICATÓRIA

A todos aqueles que caminharam ao meu lado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que sempre coloca o melhor em meu caminho, o melhor nem sempre é o mais fácil, e ainda assim Ele me dá forças para continuar firme e alcançar meus objetivos.

Ao Padre, que foi, é e sempre será meu alicerce e referência de vida. Mesmo sendo padre, criou uma filha que Deus o confiou da melhor forma, sempre me incentivando a buscar o melhor sem passar por cima dos outros.

À minha mãe, que mesmo não estando entre nós, eu sempre a sinto em todos os momentos. Lembro-me da sua risada nos momentos de descontração e dos seus conselhos e sua garra nos momentos difíceis e sempre penso que em sua imensa simplicidade de mulher sofrida, da roça e sem estudos ela sempre me ensinava uma lição de vida que ao colocar em prática eu cheguei aonde cheguei. A senhora sempre será minha inspiração de vida, sempre te amarei!

A todos da minha família que rezaram por mim, me incentivaram e me apoiaram na conquista dessa vitória!

Ao professor Geovanni, que abriu as portas do laboratório, me orientou e fez com que esse sonho trabalhoso, mas gratificante, se tornasse realidade!

À querida Gleidice, todas as palavras que eu pudesse escrever aqui não seriam suficientes para expressar tamanha gratidão e admiração que eu tenho por você. Você foi coorientadora brilhantemente, médica veterinária com excelência, professora com ternura, amiga nos momentos difíceis e mãe quando precisei de um ombro para chorar. Tenho maior orgulho de ter feito parte da sua equipe e ser uma das suas “meninas”, pois você não me ensinou apenas a oncologia, me ensinou a lutar com unhas de dentes pelo que se acredita.

Ao professor Rubens que se mostrou super solícito a colaborar com o projeto, examinou todas as lâminas com dedicação e a cada novo achado se mostrava mais empolgado, mesmo comigo no pé falando que tínhamos que olhar lâminas.

Aos presentes que o LPC me deu: Fernanda e Stéfane. Fernanda, minha melhor amiga, essencial em minha vida! Sempre esteve ao meu lado, nos bons e maus momentos, uma das melhores pessoas que Deus colocou em minha vida, é tanta afinidade e cumplicidade que nos tornamos irmãs de alma (também é daquelas que as palavras não descrevem). Stéfane, aprendi tanto com você! Principalmente a ter filtro, ou ao menos tentar. Seu jeito meigo e eu toda “ogra”, você organizada e eu bagunça só, você estudiosa e eu enrolada, mas com o tempo fui

me encantando com você e hoje somos grandes amigas que cuida uma da outra com o maior carinho do mundo, por isso não canso de dizer que amo vocês!

Ao meu namorado Renato, que nesse último ano, frente a tantas turbulências, foi meu anjo da guarda. Sempre me aconselhando com sensatez e carinho, foi meu porto seguro nos momentos de tristezas, dúvidas e ansiedade. Como sempre te digo, você foi o melhor presente que Deus me deu!

À Cecília que eu tenho maior carinho e admiração e torço para que conquiste tudo o que desejar. Você me ensinou tantas coisas que serei eternamente grata, inclusive diluir quimioterápicos.

A querida Taty que se mostrou super disposta a ajudar em todos os momentos, ficava numa felicidade só quando tínhamos que fazer uma necrópsia, me contagiava com seu jeito alegre de ser e se tornou uma pessoa muito especial pra mim, parte dessa vitória pertence a você!

Ao Diego que mesmo fazendo seu doutorado me ajudou muito, especialmente a ter forças para compreender tudo aquilo que estávamos vivendo e não me deixou esmorecer.

A todos do LPC que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho. A todos da equipe de oncologia que foram indispensáveis para a realização desse estudo. No decorrer do tempo, com a convivência, acabamos nos tornando amigos e cada um de vocês representa muito pra mim. Especialmente Adônis, Bia e Aline que sofriam com as coletas das medulas ósseas, pois não podiam esquecer e a Carla que me ajudou com seus pacientes.

Aos meninos do LPL, especialmente o Pedro que me ensinou a coletar medula óssea, Greg que me ajudou com os Elisás e testes rápidos e Adriano que graças às fantásticas aulas de macro e micro, nos tornamos grandes amigos!

A querida Mayra, pela imunoflorescência e por toda amizade nesse tempo que estivemos no mesmo departamento. Nada como afogar as mágoas como nós afogamos né amiga?

Ao LAC, especialmente Marco Túlio pelos exames realizados e boa vontade em me ajudar com a metodologia da parte hematológica e bioquímica.

Aos funcionários do HV, em especial Maysa e Diogo que sempre olhavam alguma informação que estava faltando no sistema, à Elizete que resolvia todos os nossos problemas nas terríveis terças feiras de quimioterapia e as meninas da recepção e da farmácia por tornar o trabalho mais leve.

À minha querida Teka que se foi por causa do câncer, por isso senti uma dor tão grande que eu não queria que ninguém mais sentisse, então lutei para ser oncologista e fazer o

que puder para minimizar essa dor, tanto nos pacientes quanto nos tutores. Isso tudo por me inspirar em você, minha preta!

À Amorzinha que já chegou conquistando meu coração e me trazendo alegria com seu jeito ansioso semelhante ao meu.

Às cadelas que fizeram parte desse estudo e tornaram possível esses achados que, se Deus quiser, ajudarão as cadelas que estão por vir.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos!!!

“Não há nada como o sonho para criar o futuro”.
(Victor Hugo)



Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral – ICB / UFMG, com apoio financeiro do Cnpq.

RESUMO

Os tumores mamários caninos são os processos neoplásicos mais comuns nas cadelas e representa um problema de grande impacto para a medicina veterinária. O Carcinoma Inflamatório de mama (CIM) é a apresentação clínico-patológica de uma neoplasia mamária localmente invasiva e extremamente agressiva, tendo em vista o seu alto potencial metastático, curso hiperagudo e prognóstico desfavorável. A presença de Células tumorais disseminadas (CTD's) em medula óssea (MO) tem sido demonstrada como fator prognóstico desfavorável em pacientes humanos e foi pouco pesquisada em cadelas com neoplasias mamárias. Anormalidades hematológicas e bioquímicas são frequentemente encontradas em pequenos animais portadores de neoplasias, e podem resultar dos efeitos diretos do crescimento do tumor ou de síndromes paraneoplásicas. O objetivo desse estudo foi pesquisar a presença de CTD's em MO e alterações hematológicas e bioquímicas em cadelas portadoras de neoplasias mamárias em estadiamento clínico avançado. Foram utilizadas 27 cadelas divididas em três grupos: cadelas que apresentaram metástases em linfonodos regionais (GIV / n=8) cadelas que apresentaram metástases em órgãos distantes (GV / n=8) e cadelas que apresentaram CIM (GCIM / n=11). Foi realizada punção aspirativa de MO e coleta de sangue para realização de hemograma e perfil bioquímico. Foram encontradas e confirmadas a presença de CTD's em MO em 4 cadelas que apresentavam CIM. Quanto à análise das alterações hematológicas, 43 cadelas foram divididas em três grupos, sendo eles: cadelas que apresentaram neoplasias mamárias em estadiamento clínico inicial (I,IIe III/n=17), cadelas que apresentaram neoplasias mamárias em estadiamento clínico avançado (IV e V/n=15) e cadelas que apresentaram Carcinoma Inflamatório de Mama (CI/n=11). A análise do eritrograma demonstrou diferença significativa nos valores das hemácias, hemoglobina e hematócrito entre os grupos caracterizando um quadro de anemia. A análise do leucograma demonstrou diferença significativa nos valores de leucócitos totais e neutrófilos segmentados entre os grupos, caracterizando um quadro de leucocitose neutrofílica. A análise do perfil bioquímico demonstrou diferença significativa nos valores de ALT, AST, GGT e albumina entre os grupos. Diante disso, o presente trabalho demonstrou a presença de CTD's em MO de 4 cadelas portadoras de CIM e alterações hematológicas do tipo anemia, leucocitose neutrofílica e de enzimas hepáticas em cadelas com neoplasias mamárias em estadiamento clínico avançado.

Palavras-chave: Neoplasias. Mamárias. Cadelas. CTDs. Hematologia.

ABSTRACT

Canine mammary tumors are the most common neoplastic process in the bitches and represent a major impact for veterinary medicine. Mammary inflammatory carcinoma (MIC) is the clinical-pathological presentation of a locally invasive and extremely aggressive mammary neoplasia, considering its high metastatic potential, hyperacute course and unfavorable prognosis. The presence of disseminated tumor cells (CTD's) in bone marrow (BM) has been demonstrated as an unfavorable prognostic factor in human patients and has been little researched in bitches with breast neoplasms. Hematological and biochemical abnormalities are often found in small animals with neoplasms and can result from the direct effects of tumor growth or paraneoplastic syndromes. The aim of this study was to investigate the presence of DTC in BM and hematological and biochemical changes in bitches with mammary tumors in advanced clinical stage and MIC. Twenty-seven bitches were divided into three groups: bitches with regional lymph node metastases (GIV/n=8); bitches with distal organ metastases (GV/n=8) and bitches with MIC (n=11). Aspiration of MO and blood sampling for CBC and chemistry profile was performed. The presence of CTD in BM were found and confirmed in 4 bitches with MIC. As for the analysis of hematological changes, 43 bitches were divided into three groups: bitches with breast cancer in initial clinical stage (I, II and III / n = 17), bitches with breast cancer in advanced clinical stage (IV and V / n = 15) and bitches that presented Mammary inflammatory carcinoma (MIC / n = 11). The analysis of the erythrogram showed a significant difference in the values of red blood cells, hemoglobin and hematocrit between the groups, characterizing anemia. The leukogram analysis showed a significant difference in the values of total leukocytes and segmented neutrophils between the groups, characterizing a picture of neutrophilic leukocytosis. The analysis of the biochemical profile showed a significant difference in the values of ALT, AST, GGT and albumin between the groups. In view of this, the present study demonstrated the presence of CTD's in OM of 4 bitches with MIC and hematological changes of the type anemia, neutrophilic leukocytosis and liver enzymes in bitches with breast cancer in advanced clinical stage.

Keywords: Neoplasms. Breasts. Female Dog. DTC's. Hematology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistema de estadiamento clínico para tumores mamários caninos de acordo com o sistema TNM estabelecido pela Organização Mundial da Saúde.....	40
---	----

Artigo 1

Tabela 1 - Inflammatory mammary carcinomas cases according to the histological type and grade.....	46
---	----

Tabela 2 - The number of cases, the screening method, and the technique used to confirm DTCs.....	47
--	----

Artigo 2

Tabela 1 - Sistema de estadiamento clínico para tumores mamários caninos de acordo com o sistema TNM estabelecido pela Organização Mundial da Saúde.....	53
---	----

Tabela 2 - Características clínico-patológicas de cadelas com neoplasias mamárias em estadiamento clínico inicial, avançado e CI.....	54
--	----

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos de cadelas com neoplasias mamárias em estadiamento clínico iniciais, avançados e com CI.....	55
---	----

Tabela 4 - Parâmetros bioquímicos de cadelas com neoplasias mamárias em estadiamento clínico inicial, avançado e com CI.....	56
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Sistema de estadiamento clínico para tumores mamários caninos de acordo com o sistema TNM estabelecido pela Organização Mundial da Saúde.....	40
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Bone marrow photomicrographs. Dog. (A) Epithelial cell clusters in the smear are compatible with DTCs from inflammatory mammary carcinoma. Giemsa staining, obj. 100×. (B) Histopathology of canine bone marrow with the presence of epithelial cells in a cribriform tumor, (H-E), obj. 20×. (C) Strongly positive immunostaining for cytokeratin AE1/AE3 in epithelial cells present in canine bone marrow, counterstained in hematoxylin, obj. 20×.....56

Figure 2. Subcellular localization of cytokeratin. Confocal immunofluorescence images show cytokeratin localization in green; (A) Cropped image of a bone marrow smear (scale bar 5 μm) and (B) paraffin-embedded tissue. The nuclei were stained with Hoechst and are shown in blue. The merged images confirm the subcellular localization of cytokeratin. (C) Representative image of a negative control. Images are representative of what was observed in two independent experiments. Scale Bar = 20 μm57

Figura 3. Boxplot de ALT, AST e albumina de acordo com os grupos. As partes superior e inferior da caixa indicam os quartis superior e inferior, respectivamente, a linha horizontal representa o valor mediano e a linha vertical passa do valor mínimo para o valor máximo; o ponto representa os valores discrepantes. Significância obtida pelo teste de Kruskal-Wallis..57

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A. Produção científica não relacionada à dissertação no período de março de 2016 a março de 2018.....	73
---	----

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA.....	74
ANEXO B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aos tutores.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AME	Antígeno de membrana epitelial
AST	Aspartato aminotransferase
BSA	Bovine serum albumin
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CID	Coagulação intravascular disseminada
CIM	Carcinoma inflamatório de mama
CK	Citoqueratina
COX-2	Ciclo oxigenase 2
CTC	Células tumorais circulantes
CTD	Células tumorais disseminadas
DAB	Diaminobenzidina
EDTA-k2	Etilenodiaminotetracético dipotássico
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)
EPO	Eritropoietina
EV	Escola de veterinária
FA	Fosfatase alcalina
GGT	Gama glutamiltransferase
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HER 2	Human epidermal growth factor type 2 (fator de crescimento epidérmico humano)
HT	Hematócrito
HV	Hospital veterinário
ICB	Instituto de ciências biológicas
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
LAC	Laboratório de análises clínicas
LCP	Laboratório de patologia comparada
MO	Medula óssea
NMC	Neoplasias mamárias caninas
OMS	Organização mundial da saúde
PAF	Fator de agregação plaquetária
PBS	Phosphate buffered saline
PDF	Produtos de degradação da fibrina
RDW	Red cell distribution width (distribuição dos glóbulos vermelhos)
RPM	Rotações por minuto
SO	Serviço de oncologia
SP	Síndromes paraneoplásicas
TGF β	Fator de crescimento transformador beta
TMC	Tumores mamários caninos

TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TP	Tempo de protrombina
TT	Tempo de trombina
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada
UFMG	Universidade federal de minas gerais
VCM	Volume corpuscular médio
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-1	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1
VG	Volume globular
ZEN	Zeiss Efficient Navigation

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISAO DE LITERATURA.....	23
2.1. NEOPLASIAS MAMARIAS CANINAS.....	23
2.2. CARCINOMA INFLAMATÓRIO DE MAMA.....	24
2.3. ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS.....	27
2.3.1 ANEMIA.....	28
2.3.2 LEUCOCITOSE NEUTROFÍLICA.....	29
2.3.3 ANORMALIDADES NA COAGULAÇÃO.....	30
2.3.4 COAGULAÇÃO INTRAVASCULAR DISSEMINADA (CID).....	30
2.4. ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	31
2.4.1 ALTERAÇÕES HEPÁTICAS.....	31
2.4.2 ALTERAÇÕES RENAIIS.....	32
2.5. CÉLULAS TUMORAIS DISSEMINADAS EM MEDULA ÓSSEA.....	32
3. JUSTIFICATIVA.....	36
4. HIPOTESE.....	37
5. OBJETIVOS.....	38
5.1. OBJETIVO GERAL.....	38
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
6.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	39
6.2. POPULAÇÃO.....	39
6.3. ESTADIAMENTO CLÍNICO.....	39
6.4. ANÁLISE HISTOPATOLOGICA.....	40
6.5. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	40
6.6. ANÁLISE DE IMUNOFLORESCÊNCIA.....	41
6.7. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	42
6.8. AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA.....	42
6.9. AVALIAÇÃO DE CÉLULAS DISSEMINADAS DO TUMOR EM MEDULA ÓSSEA.....	43
6.10.CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	43
6.11.ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	43
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
8. CONCLUSÕES FINAIS.....	62

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
10. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	64
11. REFERÊNCIAS.....	65
12. APÊNDICES.....	73
13. ANEXOS.....	74

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias constituem de 50 a 70% das neoplasias que acometem as cadelas (MOE, 2001; MERLO *et al.*, 2008). Aproximadamente 84% são classificadas como malignas, sendo 98% caracterizadas como carcinomas (NUNES, 2014). Cadelas que apresentam neoplasias mamárias devem ser submetidas a exame físico geral e exames complementares de sangue como hemograma e perfil bioquímico, para avaliação do estado clínico. Também são necessários exame clínico específico para avaliação das glândulas mamárias e linfonodos regionais e exames auxiliares de diagnóstico como radiografia de tórax e ultrassom abdominal a fim de determinar o estadiamento clínico da paciente bem como a presença de metástases (SONREMO, 2013).

A avaliação citológica da medula óssea não faz parte da rotina de estadiamento clínico em animais portadores de tumores epiteliais e a presença de Células Disseminadas do Tumor (CTD's) em medula óssea (MO) não tem sido utilizada como fator prognóstico em pacientes veterinários (TAYLOR *et al.*, 2013). A presença de CTD's em MO tem sido demonstrada como fator prognóstico na medicina humana, tal como tamanho do tumor, grau histológico, presença ou ausência de metástase em linfonodos e de perda de expressão dos receptores hormonais (MANSI *et al.*, 1989; BRAUN *et al.*, 2005). Pacientes com CTD's apresentaram fatores prognósticos desfavoráveis como tumores maiores, alto grau histológico, metástase em linfonodo e receptor hormonal negativo quando comparadas com mulheres sem micrometástases em medula óssea (BRAUN *et al.*, 2005).

Anormalidades hematológicas são frequentemente encontradas em pequenos animais com neoplasias, e podem resultar dos efeitos diretos do crescimento do tumor ou de síndromes paraneoplásicas. Essas alterações hematológicas e bioquímicas relacionadas com o câncer podem ser caracterizadas por diminuições ou aumentos nos números absolutos de elementos formados na circulação do sangue, alterações da hemostasia ou discrasias de proteínas plasmáticas. Em pacientes humanos, as anormalidades hematológicas são mais comuns em neoplasias hematopoiéticas ou tumores sólidos disseminados, quando comparados a massas sólidas localizadas. A mesma situação é esperada em animais com câncer (CHILDRESS, 2012).

A literatura ainda não descreveu nenhum caso de CTD's em medula óssea em cadelas portadoras de neoplasias mamárias, porém na medicina o valor das CTD's já está bem estabelecido como fator prognóstico. Portanto, faz-se necessário o presente estudo, a fim de

pesquisar a presença de CTD's em cadelas portadoras de neoplasias mamárias em estadiamento clínico avançado. É necessário também correlacionar a presença dessas CTD's com alterações hematológicas e bioquímicas e verificar o impacto no prognóstico e programação terapêutica destes animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

As neoplasias mamárias caninas (NMCs) são as lesões mais comuns em fêmeas não castradas ou castradas tardiamente e representam um problema de grande impacto para a medicina veterinária (CASSALI, 2013). São responsáveis por cerca de 50% das neoplasias em cadelas (VON EULER, 2011), sendo aproximadamente 84% classificadas como neoplasias malignas, dentre essas, 98% são caracterizadas como carcinomas (NUNES, 2014).

O risco de desenvolvimento destes tumores aumenta com a expectativa de vida, sendo em média de 9 a 11 anos de idade (SORENMO *et al.*, 2011). Fatores hormonais são bem definidos na etiologia das NMCs. De acordo com Schneider *et al.* (1969), a incidência de neoplasias malignas e benignas é reduzida quando a ovariectomia é realizada em cadelas jovens, antes do primeiro ciclo estral. O risco de ocorrência de neoplasias mamárias em cadelas castradas antes do primeiro cio é de 0,5%, aumentando, respectivamente, para 8% e 26% se a castração for realizada após o primeiro ciclo estral e depois do segundo estro. Clinicamente as NMCs apresentam-se como nódulos únicos ou múltiplos, ocorrendo em uma ou ambas cadeias mamárias, de tamanhos variados, podendo estar aderidos ou móveis (SORENMO *et al.*, 2011). Em alguns casos o tumor pode apresentar áreas de ulceração cutânea ou sinais evidentes de inflamação (QUEIROGA & LOPES, 2002). As glândulas mamárias abdominais caudais e inguinais são geralmente as mais acometidas, provavelmente pela maior quantidade de parênquima mamário presente (MISDORP, 2002; SORENMO *et al.*, 2011; CASSALI *et al.*, 2014).

A avaliação clínica de cadelas com tumores mamários deve incluir exame clínico geral e específico com palpação cuidadosa das glândulas mamárias e dos linfonodos responsáveis pela drenagem linfática (SORENMO *et al.*, 2011). Exames complementares como radiografia torácica em três incidências (ventrodorsal e laterolateral direito e esquerdo) devem ser realizados para definição do estadiamento clínico. A radiografia é o método padrão para a detecção de metástases pulmonares com diâmetro superior a 6mm, uma vez que estudos revelam que o exame de tomografia computadorizada apresenta maior acurácia na detecção de metástases com diâmetros inferiores (OTONI *et al.*, 2010; CASSALI *et al.*, 2014). Exames

adicionais, como um ultrassonografia abdominal são recomendados para a investigação de outros sítios metastáticos, principalmente o fígado.

Estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o estadiamento clínico para TMCs baseia-se no sistema TNM, o qual leva em consideração o tamanho do tumor primário (T), envolvimento de linfonodos regionais (N) e metástases em órgãos distantes (M). A partir do estadiamento clínico é possível determinar a extensão da doença, estabelecer um prognóstico e, conseqüentemente, planejar adequadamente o tratamento. Conforme tabela 1, com o sistema de estadiamento clínico é possível, posteriormente, categorizar os animais em cinco estadios de I a V (SORENMO, 2013).

O tratamento cirúrgico é a abordagem terapêutica de escolha para todas as cadelas com tumores mamários, exceto àquelas com carcinomas inflamatórios (SORENMO *et al.*, 2013; CASSALI *et al.*, 2014). A escolha da técnica cirúrgica depende da extensão da doença, drenagem linfática, tamanho e localização da lesão (SORENMO, 2003). A quimioterapia é indicada para tratamento de pacientes com estadiamento avançado, ou seja, com metástases regionais ou distantes ou em subtipos histológicos considerados de comportamento agressivo (CASSALI *et al.*, 2011; CASSALI *et al.*, 2014).

2.2. CARCINOMA INFLAMATÓRIO DE MAMA

O termo Carcinoma Inflamatório de Mama (CIM) foi utilizado inicialmente na medicina humana para designar a síndrome que envolve o rápido crescimento tumoral das glândulas mamárias associado a eritema, dor, hiperemia e hipertermia (CARIATI *et al.*, 2005). Atualmente sabe-se que o CIM é uma apresentação clinicopatológica de uma neoplasia mamária localmente invasiva e extremamente agressiva (GIORDANO *et al.*, 2003; VAN DER AUWERA *et al.*, 2006).

A cadela, até recentemente, era a única espécie animal descrita que apresenta o CIM espontaneamente, assim como acontece na mulher (PEÑA *et al.*, 2003). Em 2004, Pérez-Alenza *et al.*, descreveram os primeiros casos de CIM em três gatas. Embora a patogênese da doença permaneça obscura, sugeriu-se algumas características clínicas, genéticas, biológicas e hormonais do CIM (Perez Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.* 2003) diferem de outras formas de câncer de mama. Segundo Cassali (2003), a maioria dos trabalhos não relata predisposição racial para as NMC, incluindo o CIM. É um tipo tumoral pouco frequente, tanto nas mulheres

quanto nas cadelas. De acordo com Van Der Auwera *et al.*, (2006) o CIM é responsável por cerca de 1 a 5% das neoplasias mamárias malignas nas mulheres. Peña *et al.*, (2003), demonstraram a incidência média de 7,6% de casos de CIM dentre as cadelas que apresentam neoplasias mamárias. Porém, alguns trabalhos encontraram uma incidência maior (PÉREZ-ALENZA *et al.*, 2001; BENTUBO *et al.*, 2006). Desta forma, a prevalência ainda não está bem estabelecida.

O termo "inflamatório" é usado para designar as características clínicas deste tipo de câncer, sendo elas apresentação súbita, edema, eritema, firmeza e hipertermia das glândulas mamárias, com ou sem nódulos (PÉREZ-ALENZA *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006). Clinicamente as lesões se apresentam como massa firme e extensa em forma de placa contínua, sem limites específicos. A pele que recobre o tumor apresenta-se dolorida, hiperêmica, hipertérmica e, por vezes, com aparência semelhante a "casca de laranja" (*peau d'orange*) (CASTELLANO e IDIART, 1994). Frequentemente ultrapassa os limites tóraco-abdominais e acomete face interna dos membros posteriores, sendo comum a presença de edema tanto na região mamária, quanto nos membros e áreas de ulceração com secreção sero-sanguinolenta ou purulenta por infecção bacteriana secundária (BENTUBO *et al.*, 2006; CASSALI *et al.*, 2011). As lesões causadas pelo CIM, inicialmente, podem ser confundidas com mastite ou dermatite, o que resulta em diagnóstico tardio (PÉREZ-ALENZA *et al.*, 2001; LANA *et al.*, 2013).

O CIM apresenta-se sob duas formas: primária e secundária. O CIM primário acomete animais sem histórico prévio de tratamento cirúrgico. O nódulo, desde o início, se apresenta com o aspecto clínico de CIM, enquanto o secundário caracteriza-se pelo desenvolvimento de sinais clínicos do CIM em recidivas após cirurgias para exérese de neoplasias mamárias (PEÑA *et al.*, 2003a; SOUZA *et al.*, 2009).

Geralmente, cadelas portadoras de CIM apresentam, no momento do diagnóstico, linfonodos acometidos pela neoplasia, sendo o *status* dos linfonodos um dos fatores mais importantes para o prognóstico desta neoplasia (PEÑA *et al.*, 2003; ROBERTSON *et al.*, 2010). O desenvolvimento de metástase à distância é extremamente precoce e está presente em até 30% dos casos no momento do diagnóstico, o que se deve, principalmente, à grande capacidade destes tumores em induzir angiogênese e linfangiogênese (VAN DER AUWERA *et al.*, 2006). Atualmente, o CIM representa um dos maiores desafios na oncologia veterinária, tendo em vista o seu curso hiperagudo e prognóstico extremamente desfavorável (PEÑA *et al.*, 2003a). De acordo com a classificação TNM, para cadelas, todas as pacientes que

apresentem CIM, independente do tamanho ou presença de metástases linfáticas ou à distância, se enquadram no estadio IV (LANA *et al.*, 2013).

O diagnóstico do CIM é clínico e pode ser confirmado através do exame histopatológico, com a presença de êmbolos neoplásicos em vasos linfáticos da derme (PÉREZ-ALENZA *et al.*, 2001; PEÑA *et al.*, 2003, CASSALI *et al.*, 2011). A presença de envolvimento linfático dérmico (embolia), na ausência de características clínicas do carcinoma inflamatório, é chamado carcinoma inflamatório oculto, e isso frequentemente precede a apresentação clínica de CIM (PÉREZ-ALENZA *et al.*, 2001). O CIM está associado a carcinomas mamários de alto grau, tipos histológicos pouco diferenciados e de pior prognóstico (PÉREZ-ALENZA *et al.*, 2001; PEÑA *et al.*, 2003, CASSALI *et al.*, 2011).

A avaliação clínica de pacientes portadores de CIM não difere dos outros tipos de neoplasias mamárias e deve incluir o histórico clínico e reprodutivo completo, hemograma, bioquímica sérica, além de radiografia torácica e ultrassonografia abdominal para pesquisa de metástase (CASTELLANO e IDIART, 1994; CAVALCANTI e CASSALI, 2006).

Os principais órgãos para desenvolvimento de metástase desse tipo tumoral são linfonodos regionais e distantes, pulmão, fígado, rim, baço e coração. Outros sítios metastáticos, como órgãos reprodutivos e bexiga, também são descritos (PÉREZ-ALENZA *et al.*, 2004; VAN DER AUWERA *et al.*, 2006). Nenhuma anormalidade laboratorial específica está associada ao CIM (JAIYESIMI *et al.*, 1992). Entretanto, existem relatos da presença de anemia, leucocitose com desvio a esquerda e coagulação intravascular disseminada (CID), resultante da lesão vascular pela obstrução de vasos sanguíneos e linfáticos por êmbolos neoplásicos (SUSANECK *et al.*, 1983).

O tratamento cirúrgico é contraindicado em animais que apresentam CIM devido ao elevado risco de disseminação tumoral e desenvolvimento de síndromes paraneoplásicas (SP), a exemplo da CID, que cursa com hemorragias profusas durante o procedimento cirúrgico (CASTELLANO e IDIART, 1994). Outro motivo relatado é a dificuldade para a obtenção de margens livre em consequência da extensão da doença no momento da cirurgia (CASTELLANO e IDIART, 1994; MARCONATO *et al.*, 2009). Além disso, durante o pós-cirúrgico, quase sempre são observadas complicações como eritema, ulceração de pele, intensa reação inflamatória, cicatrização incompleta e deiscência de pontos (KIM *et al.*, 2011).

Como a excisão cirúrgica é contraindicada, até o momento a indicação são terapias paliativas com antibióticos, analgésicos que promovam o controle efetivo da dor associada e

antiinflamatórios não esteroidais, sendo os coxibes, inibidores seletivos de COX-2, os principais medicamentos associados à quimioterapia antineoplásica. O piroxicam é usado na dose de 0,3 mg/kg/oral a cada 24 horas, 0,5 mg/kg por via oral a cada 48 horas ou firocoxib 5 mg/kg oral a cada 24 horas. A administração deve durar o maior tempo possível. Outra opção para quimioterapia para esta neoplasia é a combinação de docetaxel e piroxicam (SOUZA *et al.*, 2009; CAMPOS *et al.*, 2011; CASSALI *et al.*, 2013).

Os tumores mamários malignos caninos expressam a enzima COX-2, sugerindo uma ação potencial desta enzima na carcinogênese mamária da cadela (DE NARDI, 2007; LAVALLE *et al.*, 2009). Além disso, de acordo com Queiroga *et al.*, (2005) a expressão desta enzima é maior e mais intensa nos CIM quando comparados aos carcinomas não inflamatórios.

Ainda não existe consenso sobre o tratamento quimioterápico de cadelas com CIM e apesar da maioria relatar o aumento na sobrevida dos animais com quimioterapia comparativamente à terapia paliativa, esta continua a ser baixa e geralmente, menor que 100 dias, mesmo com os diferentes protocolos utilizados (MARCONATO *et al.*, 2009; SÁ e REPETTI, 2011)

2.3. ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS

Alterações hematológicas são frequentemente encontradas em pequenos animais portadores de câncer e podem resultar de efeitos diretos do crescimento do tumor ou de síndromes paraneoplásicas (SP) (CHILDRESS, 2012). As SP são consideradas um grupo heterogêneo de alterações clínicas que ocorrem em sítios distantes dos tumores primários ou de suas metástases (BERGMAN, 2007). A origem das SPs nas neoplasias mamárias caninas ainda é pouco esclarecida, porém, sabe-se que as manifestações mais comumente observadas são anemia, leucocitose, trombocitopenias, coagulopatias e CID (STOCKHAUS *et al.*, 1999; BERGMAN, 2007). Um estudo realizado por Akinbami *et al.* (2013) demonstrou que pacientes humanos acometidos por câncer de mama, apresentam contagens disformes de células sanguíneas.

Na medicina veterinária, em relação ao câncer de mama, existem poucos estudos correlacionando achados laboratoriais anormais com esse tipo de tumor e estadiamento (STOCKHAUS *et al.*, 1999). Segundo Bergman (2013) estudos sugerem que as alterações

nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e hemostáticos em pacientes com câncer sejam investigadas com o objetivo de identificar anormalidades, estabelecer o prognóstico e tratar a síndrome antes de outros procedimentos terapêuticos, pois essas alterações podem ter maior morbidade que o próprio tumor.

2.3.1 ANEMIA

A anemia é a alteração hematológica mais comum associada às neoplasias, sendo detectada em pelo menos 30% dos cães com tumores malignos (ABBO, 2007). A maioria dos distúrbios crônicos, com um componente inflamatório, iniciará o processo de anemia e, entre eles, a neoplasia maligna, capaz de provocar necrose e/ou inflamação ao redor ou no interior do tumor (DA SILVA *et al.*, 2014).

Em pacientes com neoplasia, a anemia pode ter muitas origens, entre as quais: anemia da doença crônica, anemia por hemólise, por esplenomegalia com sequestro de eritrócitos, por invasão de medula óssea, por perda de sangue e anemia secundária ao tratamento (MANGIERI, 2009). No carcinoma mamário as origens de anemia mais comuns estão relacionadas à anemia da doença crônica, anemia da inflamação, síndrome anêmica associada com citocinas ou anemia do câncer. O mecanismo dessa alteração está associada à secreção tumoral de citocinas como a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) responsáveis por promover sequestro de ferro, ocasionar a redução da meia vida das hemácias e da secreção de eritropoietina (EPO). Anemias hemolíticas, microangiopáticas e imunomediadas por formação de imunocomplexos também são relatadas nas neoplasias mamárias caninas (MANGIERI, 2009).

A diminuição da meia vida das hemácias ocorre devido ao aumento da produção de IL-1, que leva os eritrócitos mais jovens a uma hemólise seletiva dentro do sistema reticuloendotelial (MANGIERI, 2009). Pode ainda ocorrer alteração morfológica ou fragmentação do eritrócito durante o percurso percorrido em um vaso sanguíneo anormal (RIBAS, 2012). Sequestro de ferro com bloqueio de sua reutilização ocorre por ação dos macrófagos que fagocitam a lactoferrina produzida pelos neutrófilos no foco inflamatório, impedindo-o de ser utilizado, além da produção de IL-1 e TNF- α também pelos macrófagos o que induz a produção de apoferritina (proteína de fase aguda), que quando fagocitada inutiliza seu conteúdo de ferro (BERGMAN, 2007; LEAL, 2009; MANGIERI, 2009). A redução da

secreção da EPO se deve a uma produção insuficiente, devido a uma falha na síntese de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) induzida pelas citocinas da inflamação IL-1, IL-6, TNF- α e fator de crescimento transformador β (TGF β). Outra possível explicação é a produção de anticorpos anti-EPO, e ainda uma maior produção de óxido nítrico provocando a inibição direta da formação de colônias eritróides (BERGMAN, 2007 e MANGIERI, 2009). Na maioria dos pacientes a anemia caracteriza-se, em geral, como normocítica e normocrômica hiporregenerativa (DOBSON, 2003).

2.3.2 LEUCOCITOSE NEUTROFÍLICA

Em cães com neoplasias primárias, a leucocitose neutrofílica foi detectada em 45,8% dos animais (CHILDRESS, 2012). Estudos demonstram que parâmetros, como a contagem de leucócitos, podem apresentar um valor diagnóstico e prognóstico para diversos tumores malignos (ALIUSTAOGLU *et al.*, 2010). O aumento no número de neutrófilos circulantes tem sido associado a uma variedade de neoplasias em humanos e cães (BERGMAN, 2013). No caso da leucocitose neutrofílica, sugere-se que haja uma estimulação do fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos, pela inflamação crônica ou necrose ocasionadas pelo processo neoplásico, além disso, IL-1 e TNF- α também podem induzir neutrofilia estimulando a produção de fatores de crescimento (CHILDRESS, 2012). Ribas (2012) descreve a presença de leucocitose neutrofílica com desvio para a esquerda como uma das características encontradas nos leucogramas das cadelas estudadas. A leucocitose neutrofílica está fortemente associada ao pior prognóstico e mortalidade em seres humanos com neoplasia, sobretudo naqueles em tratamento quimioterápico (STOCKHAM *et al.*, 2003). A correlação positiva da leucocitose com o estadió avançado da doença não está bem descrita na literatura, mas sugere-se que a cronicidade da neoplasia acarreta resposta inflamatória sistêmica e, por consequência, leucocitose neutrofílica.

A monocitose é característica de processos inflamatórios crônicos e o aumento moderado no número de monócitos, associado ou não a quadros de neutrofilia, pode ser observado em pacientes com câncer, sobretudo em neofomações com áreas de necrose (STOCKHAM *et al.*, 2003; CHILDRESS *et al.*, 2012).

2.3.3 ANORMALIDADES NA COAGULAÇÃO

Anemia e coagulopatias são verificadas com maior frequência em cães com tumores de mama, carcinomas inflamatórios, mastocitomas, hemangiossarcomas, dentre outros (BERGMAN, 2007). Em um estudo no qual se verificou a relação entre as anormalidades na coagulação e alguns aspectos do carcinoma mamário em cães, pôde-se identificar que 67% das fêmeas avaliadas possuíam algum tipo de anormalidade na coagulação. Tais alterações foram correlacionadas com a progressão tumoral (STOCKHAUS *et al.*, 1999).

Os mecanismos da trombocitopenia dos animais com câncer incluem o aumento da destruição, sequestro/consumo de plaquetas ou redução da produção (BERGMAN, 2007). A evidência de anormalidades da coagulação de origem paraneoplásica em pacientes com neoplasia mamária pode evoluir para complicações hemorrágicas durante o tratamento (MANGIERI, 2009).

2.3.4 COAGULAÇÃO INTRAVASCULAR DISSEMINADA (CID)

É a alteração na coagulação mais importante que acomete pacientes com neoplasias mamárias, especialmente cadelas com CIM. A CID desenvolve-se em decorrência da produção excessiva de proteases responsáveis pela formação de fibrina e desenvolvimento da fibrinólise em associação com falhas nos mecanismos inibitórios produzindo um estado de hipercoagulabilidade descontrolada, esse estado resulta em formação de microtrombos e trombos, os quais provocam maior consumo de plaquetas e fatores de coagulação, além de isquemia e necrose subsequente, com dano endotelial pelo maior depósito de fibrinas e plaquetas. De uma maneira geral, a CID tem uma fase de hipercoagulabilidade seguida de uma fase hemorrágica (MANGIERI, 2009).

No paciente com câncer, o mecanismo da fibrinólise ou trombose induzida por neoplasias envolve a produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 que induzem a formação do fator tecidual (tromboplastina) por parte das células neoplásicas; produção de proteases específicas (substâncias pró-coagulantes do câncer) pelas células neoplásicas através da ativação direta do fator X (fator de Stuart-Prower), sem a necessidade da participação direta do fator VII (fator estável); produção de fator tecidual por parte dos monócitos/macrófagos em resposta a antígenos neoplásicos (ativa o fator VII e, dessa forma,

ativará os fatores X e IX, fator de Christmas); e a geração de depósitos de fibrina e plaquetas induzidos pelas células neoplásicas, na forma direta ou indireta, por meio da ação de citocinas, tais como o TNF- α , IL-1, fator de agregação plaquetária (PAF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (MANGIERI, 2009).

O diagnóstico pode ser feito através dos testes que avaliam a coagulação em que a trombocitopenia, prolongamento do tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) ou tempo de trombina (TT), elevação dos produtos de degradação da fibrina (PDFs) e diminuição dos níveis de fibrinogênio plasmático são comumente identificados (STOCKHAUS *et al.*, 1999; BROOKS & LAFORCADE, 2010). Alguns trabalhos também sugerem a dosagem do D-dímero como teste diagnóstico (DUDA, 2017).

2.4. ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS

Diversas anormalidades bioquímicas foram descritas nos pacientes oncológicos (KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2006; BERGMAN, 2013), porém nenhuma foi associada diretamente às neoplasias mamárias caninas.

2.4.1 ALTERAÇÕES HEPÁTICAS

Alterações hepáticas, como elevação significativa da fosfatase alcalina (FA), relacionada aos tumores mamários caninos já foram descrita (KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2006). Apesar de ter mecanismo pouco esclarecido, especula-se que seja uma resposta a uma reação por indução enzimática provocada pela célula neoplásica (MANGIERI, 2009). Na SP, quando a massa neoplásica é completamente eliminada, a concentração de FA deve retornar à faixa normal em um período de 90 a 120 dias. Ribas (2009), em seu estudo, encontrou também elevação de FA, além de GGT e ALT nos animais observados, que também pode estar associado com quadros de colestase, hiperplasia ou metástases hepáticas.

2.4.2 ALTERAÇÕES RENAIAS

Apesar de existirem poucos relatos sobre glomerulopatias caninas (YHEE *et al.*, 2010), sua associação com doenças neoplásicas é frequente, podendo alcançar 17 a 40% em caninos e felinos (FORRESTER, 2001). Na literatura médica, a associação entre neoplasias e glomerulopatias é bastante referida e, muitos relatos têm evidenciado que a proteinúria apresenta correlações positivas com o grau de malignidade e com prognóstico reservado (MILMAN, 1996; JORGENSEN *et al.*, 2008).

Em seu estudo, Crivellenti (2014) evidenciou uma importante associação entre carcinoma mamário e alterações renais, particularmente depósitos eletrodensos subendoteliais. Não foram encontradas alterações de marcadores como creatinina, ureia e densidade urinária.

2.5. CÉLULAS TUMORAIS DISSEMINADAS (CTD'S) EM MEDULA ÓSSEA

O estadiamento clínico padrão para carcinoma em pacientes veterinários inclui exames como radiografia torácica em três incidências, ultrassom abdominal e, em alguns casos, tomografia computadorizada. No entanto, falhas no tratamento podem ocorrer eventualmente, devido a metástases não diagnosticadas de tumores epiteliais (TAYLOR *et al.*, 2013).

As metástases são a principal causa de morte em pacientes com tumores epiteliais sólidos (ARGYLE *et al.*, 2003). Em 2002, Bernards e Weinberg apresentaram um novo modelo de metástase, em que a capacidade metastática é adquirida durante estágios iniciais do desenvolvimento do tumor primário. Essas células metastáticas conhecidas como Células Tumorais Disseminadas (CTD's) podem ser detectadas nos estágios iniciais da progressão do tumor em sangue periférico, onde são chamadas de Células Tumorais Circulantes (CTC's) e na MO de pacientes com câncer usando métodos de detecção altamente sensíveis (PANTEL *et al.*, 2004). A presença de CTD's também é descrita por sinônimos, como micrometástases da medula óssea ou doença residual mínima, mas o termo CTD's é o mais preciso. A MO emergiu como um órgão comum de eleição para células epiteliais metastáticas, independente do local do tumor primário e o padrão de metástases (BRAUN *et al.*, 2000, PANTEL *et al.*, 2004).

Na medicina humana, as CTD's ou CTC's são mais frequentemente identificadas em pacientes com carcinoma mamário, mas também foi relatada como um indicador prognóstico em carcinomas de bexiga, próstata, câncer de pulmão de células não pequenas e câncer de

pulmão de pequenas células (ALI *et al.*, 2010; KREBS *et al.*, 2011). Na medicina veterinária, relatos de CTD's provenientes de neoplasias mamárias caninas são escassos, porém já foram encontradas micrometástases em MO de adenocarcinoma de saco anal, carcinomas de pele e insulinooma em cães (PICKENS *et al.*, 2005; TAYLOR, 2013).

O processo metastático é muito complexo e numerosos modelos hipotéticos foram propostos para explicar a "cascata da metástase" e os vários requisitos que a célula metastática deve cumprir para se destacar do tumor primário, sobreviver e dar origem a um novo foco do tumor (MISDORP & HERDER, 1966). Estudos também sugerem que os tumores primários podem secretar fatores que preparam o microambiente pré-tumoral e favoreçam a colonizações de células cancerosas precocemente (HÜSEMANN *et al.*, 2008). A exemplo, a presença de Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1 (*VEGFR1*) em progenitores hematopoiéticos na MO que pode ser um fator crucial na implantação de DTC's, pois são responsáveis por iniciar o nicho pré metastático. No entanto, a inibição mediada por anticorpos anti-*VEGFR1* interrompe a formação de aglomerados pré-metastáticos e impede a metástase em MO e posteriormente no osso (KAPLAN *et al.*, 2005).

Estudos demonstraram uma interação recíproca entre o microambiente da MO e do osso, o que é fundamental para estabelecer crescimento metastático ósseo (LANA *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2017). Essa interação é dada pela liberação de fatores de crescimento locais por osteoblastos e osteoclastos ativos em estreita proximidade com micrometástase em MO, o que pode provocar o crescimento e a invasão das células do câncer de mama levando ao desenvolvimento de metástase óssea (VAN DER PLUIJM G. *et al.*, 2005).

Evidências sugerem que apenas certas subpopulações de células tumorais iniciais do tumor adquirem as características necessárias para se separar do local primário e entrar na circulação e é cada vez mais proposto que apenas algumas subpopulações de CTCs/CTD's "agressivas" possam progredir a metástases (FEHM *et al.*, 2006).

O método mais utilizado para identificação das CTD's é a imunocitoquímica, mas já foram demonstrados outros métodos mais sensíveis (ALIX-PANABIÈRES *et al.*, 2008). Um dos marcadores imunohistoquímicos mais utilizados para a identificação de CTD's derivados de um tumor epitelial como o câncer de mama em um compartimento mesenquimal é a citoqueratina (CK), a proteína mais importante do citoesqueleto das células epiteliais, não expressada pelas células hematopoéticas. Quando células CK-positivas podem ser detectadas em um compartimento que expressa CK-negativas, como a MO, a disseminação de um tumor epitelial pode ser assumida (DEARNALEY *et al.*, 1981). Portanto, estudos em andamento

estão otimizando e padronizando técnicas de detecção de CTD, incluindo uma comparação clínica direta entre os anticorpos A45-B/B3 e AE1/AE3 em relação à sensibilidade e especificidade (FEHM, *et al.*, 2006). Martinez *et al.*, (2014) sugeriram em seu estudo, a inclusão do anticorpo anti AME (antígeno de membrana epitelial) para detecção de CTD's em aspirados de MO.

Segundo Pantel *et al.* (1993), a maioria dessas células está em estado latente, confirmado pela baixa expressão de Ki67. A latência das CTD's é considerada a razão da reativação tardia dessas células e conseqüentemente a recorrência do câncer em indivíduos anos ou décadas após remoção do tumor primário e quimioterapia adjuvante (ITO *et al.*, 2012). Mitra *et al.*, (2015) explicam que as CTD's entram em latência através de três mecanismos semelhantes: quiescência, transição epitélio-mesênquima e células tronco cancerígenas. Banys *et al.*, (2012) demonstraram a disseminação precoce de células cancerosas na circulação e medula óssea no contexto de pacientes com carcinoma ductal in situ. A remoção cirúrgica da lesão primária pode privar estas células de fatores de ação sistêmicos, importantes para o crescimento e, conseqüentemente, responsáveis pela dormência e pelo estabelecimento de metástases em outros órgãos, posteriormente (GERSTEN *et al.*, 2010).

CTD's podem ser detectadas em, aproximadamente, 33% dos pacientes com câncer de mama sem qualquer evidência clínica de doença metastática (FEHM *et al.*, 2006). Em um estudo realizado por Braun *et al.*, (2005) avaliou 4.703 mulheres com câncer de mama invasivo e verificaram que CTD's estavam presentes em MO de 1.438 (30,6%) pacientes.

As pacientes portadoras de neoplasias mamárias com presença de CTD's apresentavam tumores de maior tamanho e grau histológico, frequentemente receptores hormonais negativos e metástases em linfonodos mais frequentes. Essa presença foi associada a uma baixa sobrevida livre de doença e sobrevida global (Braun *et al.*, 2005).

A presença de CTDs na MO foi um fator prognóstico independente, não apenas ao diagnóstico primário, mas também quando presentes durante o acompanhamento sem recorrência. Essa presença prevê um aumento em duas vezes no risco de desenvolvimento posterior de metástases e morte associada ao tumor (BRAUN *et al.*, 2000; BRAUN *et al.*, 2005; FEHM *et al.*, 2006; SCHINDLBECK *et al.*, 2011).

Apesar de ser considerado um fator prognóstico ruim, as CTD's em MO representam uma ferramenta de seleção de pacientes para tratamentos individualizados, a fim de se obter eficácia terapêutica (FEHM *et al.*, 2006). Com base na hipótese das CTD's serem uma das origens da doença metastática, essas células podem ser alvos terapêuticos valiosos para o

tratamento adjuvante (ALIX-PANABIÈRES *et al.*, 2008). Uma vez que essas células permanecem não proliferativas, os agentes citotóxicos padrões não são ativos. Por esse motivo, a terapia baseada em anticorpos parece ser uma opção terapêutica e as terapias direcionadas guiadas pela fenotipagem das CTD's podem estar entre as opções de tratamento mais promissoras (FEHM *et al.*, 2006; ITO *et al.*, 2012).

Além dos dados conclusivos sobre a relevância prognóstica da presença de CTD's no momento do diagnóstico, o monitoramento da eficácia terapêutica e a avaliação do risco residual durante o acompanhamento representam uma opção promissora para a utilidade clínica da detecção de CTD, pois podem levar a novas abordagens terapêuticas, melhor controle da doença em longo prazo e maiores tempos de sobrevida (FEHM *et al.*, 2006; ITO *et al.*, 2012).

3. JUSTIFICATIVA

Baseado na elevada incidência de neoplasias mamárias caninas e na escassez de trabalhos sobre pesquisas de CTD's em MO, o que está bem estabelecido em mulheres com esse tipo de neoplasia, e na carência de trabalhos sobre alterações hematológicas e bioquímicas de cadelas com tumores de mama em estadiamento clínico avançado e CIM, faz-se necessário a realização do presente trabalho. É importante que os veterinários sejam capazes de reconhecer alterações hematológicas e bioquímicas relacionadas à neoplasia, pois podem ser marcadores clínicos de tipos específicos de câncer e facilitar a sua identificação diminuindo assim o tempo do diagnóstico, ajudar como marcadores de resposta terapêutica, exigir tratamento específico além do tratamento do câncer e influenciar o prognóstico de certos tumores (Childress, 2012).

4. HIPÓTESE

A MO é um órgão alvo para metástases de neoplasias mamárias caninas. As neoplasias mamárias caninas em estadiamento clínico avançado são capazes de causar alterações hematológicas e bioquímicas.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Pesquisar a presença de CTD's em MO e avaliar o hemograma e exames bioquímicos de cadelas portadoras de neoplasias mamárias em estadiamento clínico avançado e CIM.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Pesquisar a presença de CTD's em MO de cadelas portadoras de neoplasia mamária em estadiamento clínico IV e V e cadelas portadoras de CIM.

Avaliar as alterações de perfil hematológico (eritrograma, leucograma e plaquetograma) de sangue periférico de cadelas portadoras de neoplasia mamária em estadiamento clínico IV e V e cadelas portadoras de CIM, comparando com valores de referência para a espécie.

Avaliar as alterações de perfil bioquímico (ALT, AST, FA, Ureia, Creatinina, GGT, Glicose, Proteínas totais, Albumina e Globulina) de sangue periférico de cadelas portadoras de neoplasia mamária em estadiamento clínico IV e V e cadelas portadoras de CIM, comparando com valores de referência para a espécie.

Correlacionar a presença de CTD's em MO com alterações hematológicas e bioquímicas.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. ASPECTOS ÉTICOS

O uso de animais e procedimentos para este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (protocolo 200/2016).

6.2. POPULAÇÃO

Foram incluídas cadelas atendidas pelo Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG (EV/UFMG), diagnosticadas com neoplasias da glândula mamária em estadiamento clínico avançado e submetidas à exérese cirúrgica. Também foram incluídas cadelas diagnosticadas com CIM, não sendo submetidas ao tratamento cirúrgico. As cadelas foram divididas em três grupos em um estudo prospectivo:

G1: 8 animais portadores de neoplasias mamárias malignas com linfonodos positivos para metástases ($T_{1,2,3}N_1M_0$).

G2: 8 animais portadores de neoplasias mamárias malignas com metástases à distância no momento da avaliação clínica ($T_{1,2,3}N_{0,1}M_1$).

G3: 11 animais portadores de carcinomas inflamatórios.

Não foi incluído um grupo controle no estudo. As variáveis observadas no hemograma foram comparadas com os valores de referência para a espécie.

6.3. ESTADIAMENTO CLÍNICO

O estadiamento clínico estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de acordo com o sistema TNM avalia o tamanho do tumor primário (T), envolvimento de linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M). Com este sistema de estadiamento é possível, posteriormente, a categorização dos animais em cinco estádios de I a V (adaptado de OWEN, 1980).

Tabela 1- Sistema de estadiamento clínico para tumores mamários caninos de acordo com o sistema TNM estabelecido pela Organização Mundial da Saúde.

Estadiamento	Tamanho	Linfonodos regionais	Metástases distantes
I	T ₁	N ₀	M ₀
II	T ₂	N ₀	M ₀
III	T ₃	N ₀	M ₀
IV	T ₁₂₃ e Carcinoma Inflamatório	N ₁	M ₀
V	T ₁₂₃	N _{0,1}	M ₁

Estadiamento clínico para tumores mamários caninos: T = tamanho do tumor primário, onde T₁ < 3,0cm de diâmetro; T₂ = 3,0 – 5,0cm de diâmetro; T₃ > 5,0cm de diâmetro. N = envolvimento de linfonodos regionais, onde N₀ = sem evidência de metástases; N₁= linfonodos regionais ipsilaterais envolvidos; M=metástases em órgãos distantes, onde M₀ = sem evidências de metástases à distância, M₁= presença de metástases em órgãos distantes ou linfonodos que não drenam as cadeias mamárias (Adaptado de OWEN, 1980).

6.4. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Secções histológicas de 4µm foram obtidas dos fragmentos mamários fixados em formol neutro tamponado a 10%, processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina e coradas pela técnica da Hematoxilina-Eosina. A identificação do tipo histológico foi realizada de acordo com o “*Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors*” (CASSALI *et al.*, 2014).

6.5. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Para realização de imuno-histoquímica as lâminas gelatinizadas contendo as secções histológicas de 4µm foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em uma série de álcoois progressivamente diluídos (absoluto I e II, 90%, 80%). As reações de recuperação antigênica foram realizadas em calor-úmido pressurizado (Pascal®) com citrato pH 6,0 (DakoCytomation Target Retrieval Solution) a 125°C por 2 minutos. Após recuperação antigênica, as lâminas foram resfriadas por 20 minutos. Em seguida, foram feitas três lavagens de cinco minutos em PBS. Foi realizado o bloqueio da peroxidase e da proteína endógena, com três lavagens em PBS entre os bloqueios. Posteriormente, todos os cortes histológicos foram recobertos com o anticorpo primário e incubados em câmara úmida por 16

horas. Após o período de incubação foram feitas três lavagens com PBS e aplicou-se sobre os cortes histológicos o anticorpo secundário, seguido de lavagem em PBS e adição do polímero. A revelação colorimétrica foi realizada com diaminobenzidina (DAB), por três minutos, e a contra-coloração com Hematoxilina. Foram utilizados todos os reagentes do Kit Novo Link – Leica® de acordo com as instruções do fabricante.

6.6. ANÁLISE DE IMUNOFLORESCÊNCIA

As lâminas representativas de cada caso foram descoradas em água corrente, lavadas em solução de PBS 1x (Phosphate Buffered Saline: PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl e 10 mM phosphate buffer solution, pH 7.4) (Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA), em seguida incubadas em PBS contendo 0.2% de Triton 100-X (Sigma-Aldrich) por mais 20 minutos e bloqueadas em PBS contendo 1% de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich) durante 30 minutos. Os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal anti-pan-citoqueratina conjugado ao Alexa Fluor 488 (1:250, clone AE1/AE3, Sigma-Aldrich, Carlsbad, Califórnia, EUA), overnight a 4°C. Após este período as amostras foram lavadas três vezes durante cinco minutos em PBS. A sonda para núcleo Hoechst 33258 (1µg/mL, Life Technologies) foi adicionada durante 1 hora a temperatura ambiente. Após este período as amostras foram novamente lavadas 3 vezes em PBS durante 10 minutos e montadas utilizando a solução Prolong Gold Antifade reagent (Life Technologies). Os controles negativos foram incluídos em todas as reações apenas omitindo-se os anticorpos primários. As imagens foram coletadas utilizando microscópio Confocal Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss, Jena, Germany) com objetiva de imersão a óleo de 40x e abertura numérica de 1.3. As amostras foram excitadas a 405 nm e sua emissão observada a 415-480 nm para detecção da sonda nuclear Hoechst e a 488 nm e sua emissão observada a 500-525 nm para detecção do Alexa Fluor 488. Foram avaliadas áreas aleatórias da medula e foram coletadas cinco imagens de cada caso. O software Zen 2 foi utilizado para as análises de fluorescência.

6.7. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de sangue para realização de exames de risco cirúrgico no momento anterior à exérese cirúrgica das neoplasias mamárias no qual se incluíam hemograma, Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), FA, uréia, creatinina, GGT, glicose, albumina e globulina. Nas cadelas portadoras de carcinoma inflamatório, a coleta de sangue para realização dos exames foi realizada no momento do diagnóstico. Essas amostras foram coletadas por punção venosa das veias jugular, cefálica ou safena a vácuo, após antissepsia adequada do local, com auxílio de agulha 22G na seguinte ordem: 1,5 mL em tubos com anticoagulante etilenodiaminotetracético dipotássico (EDTA-K2) e 2,5 mL em tubos sem anticoagulante. Os exames foram realizados de forma rotineira pelo Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da EV / UFMG.

A punção de medula óssea das cadelas em estadiamento clínico avançado foi realizada de acordo com o porte da paciente: manúbrio do esterno em animais de grande porte e crista ilíaca em animais de pequeno porte, no momento da cirurgia com as cadelas sob anestesia geral. Após antissepsia foi realizada a punção e aspiração com auxílio de agulha 40x12mm e seringa de 10ml previamente heparinizada. Para penetrar no espaço medular dos ossos, foi aplicada uma pressão manual moderada à agulha, girado-a e alternando os movimentos para direita e esquerda. O material obtido foi depositado em lâmina de vidro sob a forma de *squash*, seco ao ar, fixado com álcool metílico e corado pela técnica de Giemsa. A coleta da MO das cadelas que apresentavam CIM, foi realizada no momento do diagnóstico sob anestesia local e utilizando-se a técnica descrita acima.

6.8. AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA

O hemograma foi realizado, a partir do sangue armazenado em tubos contendo EDTA, em Analisador Hematológico Veterinário icounter vet pelo método de impedância, que fornece a contagem automática de leucócitos totais, hemácias, plaquetas, concentração de hemoglobina e valores de Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Red cell distribution width (RDW- Distribuição dos glóbulos vermelhos). O volume globular (VG) foi avaliado, também, pelo micro hematócrito (ht), centrifugado por cinco minutos a 10000 rotações por

minuto (RPM) para comparação com o resultado automático. A contagem diferencial de leucócitos, realizada a partir da contagem de 100 células, e a análise citomorfológica foi realizada em microscopia óptica, em objetivas de 20X, 40X e 100x, utilizando esfregaços sanguíneos corados em Panótico. Contagens plaquetárias automáticas que não se encontram no valor de normalidade foram conferidas a partir da observação em lâmina contando-se a média em dez campos de 100X, com posterior multiplicação por 20000. Os valores de referência seguem Jain (1993).

6.9. AVALIAÇÃO DE CTD EM MEDULA ÓSSEA

Foi avaliada a presença de células neoplásicas em todos os campos das lâminas assim como a celularidade global, presença e a intensidade de megacariócitos, adipócitos, células do estroma e outros tipos de células.

6.10. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Pacientes que apresentaram comorbidades como Leishmaniose e hemoparasitoses detectadas por exames físicos e confirmadas pelo exame de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA - ensaio de imunoabsorção enzimática) foram excluídas do trabalho devido às influências no hemograma, perfil bioquímico e análise de MO.

6.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste global de Kruskal-Wallis, os valores foram considerados estatisticamente significativos com $p < 0,05$.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão apresentados sob a forma de artigos científicos.



Bone Marrow Metastasis in Inflammatory Mammary Carcinoma: A Case Report in Dog

MIRIÁ R. DE OLIVEIRA¹, TATIANY L. SILVEIRA¹, RUBENS A. CARNEIRO², GLEIDICE E. LAVALLE², MICHELE A. RODRIGUES¹, GEOVANNI D. CASSALI^{1*}

¹Laboratory of Comparative Pathology, Department of General Pathology, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais; ²Veterinary Hospital, Veterinary School, Federal University of Minas Gerais.

Abstract | We report four cases of disseminated tumor cells (DTCs) present in the bone marrow (BM) of canines with inflammatory mammary carcinoma (IMC). The diagnosis was made by cytological and histopathological analysis of BM biopsy and was confirmed by immunohistochemistry and immunofluorescence methods using an anti-cytokeratin AE1/AE3 antibody. The cytologic evaluation followed by BM immunocytochemistry is a widely used method for the investigation of DTCs in women with breast neoplasms. Few studies have reported the presence of these cells in dogs, including IMC. The presence of these cells in the BM of women with breast tumors is related to tumor recurrence. This study demonstrates the presence of DTCs in the BM of dogs with IMC. Furthermore, the observation of the presence of micrometastasis at the time of diagnosis combined with cytokeratin immunocytochemical analysis could be a valuable prognostic tool in veterinary patients.

Keywords | Bone marrow, Disseminated tumor cells, Metastasis, Inflammatory carcinoma, Dog

Received | May 22, 2020; **Accepted** | July 15, 2020; **Published** | August 10, 2020

*Correspondence | Geovanni Dantas Cassali, Laboratório de Patologia Comparada, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais. Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627. ZIP Code: 31270-901. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; **Email**: cassalig@icb.ufmg.br

Citation | Oliveira MR, Silveira TL, Carneiro RA, Lavalle GE, Rodrigues MA, Cassali GD (2020). Bone marrow metastasis in inflammatory mammary carcinoma: A case report in dog. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 8(10): 1087-1090.

DOI | <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2020/8.10.1087.1090>

ISSN (Online) | 2307-8316; **ISSN (Print)** | 2309-3331

Copyright © 2020 Oliveira et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

INTRODUCTION

The inflammatory mammary carcinoma (IMC) is the clinical-pathological presentation of a local invasion and extremely aggressive mammary neoplasia (Peña et al., 2003). Currently represents one of the biggest challenges in veterinary oncology, considering its high metastatic potential, hyperacute course, and poor prognosis (Janni et al., 2011).

In veterinary and human oncology, metastatic disease is one of the leading causes of death in patients, especially in those with solid carcinomas (Argyle, 2003). In 2002, a new model of metastasis was proposed, in which the cancer cells acquired metastatic capacity during the initial stages of the primary tumor (Rene and Weinberg, 2002). When these cells are found in bone marrow (BM), they are called disseminated tumor cells (DTCs) (Pantel et al., 1993).

Previous studies demonstrated that persistent DTCs during follow-up in women with a primary diagnosis of early breast cancer predicted relapse and death significantly, and these observations provide strong evidence for its value as a monitoring tool (Janni et al., 2011; Taylor et al., 2013). Finally, a meta-analysis evaluating patients with primary breast cancer demonstrated that the presence of circulating tumor cells could be associated with poor overall survival and biologically more aggressive phenotypes (Zhao et al., 2011). Cytologic examination of BM is not a routine part of staging in veterinary patients with epithelial tumors. The micrometastasis presence at the time of diagnosis has not been reported as a prognostic tool in veterinary patients. This study aimed to evaluate the presence of DTCs in BM of dogs with IMC.

For immunohistochemistry, the gelatinized slides containing the 4- μ m histological sections were deparaffinized in

xytol and rehydrated in a progressively diluted alcohol series. Antigen retrieval reactions were performed under pressurized moist heat (Pascal®) with citrate buffer pH 6.0 (Dako Cytomation Target Retrieval Solution) at 125°C for 2 minutes. After antigen retrieval, the slides were cooled for 20 minutes, followed by three 5-minute washes in PBS. Peroxidase and endogenous protein blocking were performed with three PBS washes between each blocking step. Subsequently, all histological sections were coated with the primary mouse monoclonal antibody against Pan-Cytokeratin (1:500, clones AE1/AE3, Dako North America, Carpinteria, California, USA) and incubated in a humidified chamber for 16 hours. After the incubation period, three PBS washes were performed, and the secondary antibody was applied to the histological sections, which was followed by washing in PBS, and then the addition of the polymer. Colorimetric development was performed using diaminobenzidine (DAB) for 3 minutes. Sections were counterstained in Harri's hematoxylin (H-E). All reagents from Novo Link Kit (Leica®) were used according to the manufacturer's instructions. For controls were used mammary carcinoma samples, and the negative control was omitting the primary antibody.

Immunofluorescence staining was performed as previously described by Rodrigues et al. (2016). Cells were labeled with a mouse monoclonal antibody against Pan-Cytokeratin conjugated to Alexa Fluor 488 (1:250, clones AE1/AE3, Sigma-Aldrich, Carlsbad, California, USA) overnight at 4°C and Hoechst 33258 (1 mg/mL, Life Technologies) for 1 hour at room temperature. Next, samples were washed three times in PBS for 10 min and then mounted with Hydromount (Electron Microscopy Sciences). The primary antibody was omitted in all negative controls. Images were collected using a Zeiss LSM 880 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) using a 40× 1.3 NA oil objective lens and a GaAsP detector. Samples were excited at 405 nm and observed at 415–480 nm to detect Hoechst and at 510–540 nm to detect Alexa 488. The software Zeiss Efficient Navigation (ZEN) was used for fluorescence analyses and image adjustments according to the negative control (Rodrigues et al., 2016). For all negative controls were used BM smears from the same dogs (Figure 2).

Four female dogs were clinically diagnosed with inflammatory mammary carcinoma at “Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (SO-UFGM)” and submitted to fine-needle aspiration (FNA) at the moment of the clinical diagnostic. All dogs presented the secondary form of the disease; they developed the IMC during the recurrence of the mammary tumor and also presented metastasis in lymph nodes and distant organs. When the dogs presented primary mammary neoplasia, they were forwarded to surgery. The tumor was removed and sent to “Laboratório de

Patologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas (LPC-ICB) da UFGM” for the diagnostic (Elston, 1991; Misdorp et al., 1999; Goldschmidt et al., 2011; Cassali et al., 2014).

The clinicopathological findings are represented in Table 1.

Table 1: Inflammatory mammary carcinoma cases according to the histological type and grade

HISTOLOGICAL TYPE	GRADE I	GRADE II	GRADE III
Micropapillary carcinoma	0	1	1
Papillary carcinoma with micropapillary areas	1	0	0
Cribiform carcinoma	0	1	0

The local for the FNA was determined according to the size of the patient. In medium and large dogs, the biopsy was performed in the sternum manubrium; and in small dogs, it was made on the iliac crest. The asepsis and anaesthesia were made in the local of the biopsy. It was inserted an 18G needle with a 10 mL syringe into the bone by pressure and using clockwise and counter clockwise movements until it was firmly fixed. The BM aspiration was performed, and the material was deposited in slides for the squash and Giemsa staining (Taylor et al., 2013). The BM microscopic screening method of all samples was done, and it was analyzed the presence of epithelial-like cells, that is suggestive of DTCs. The presence of these cells was observed in four samples of BM (Figure 1A).

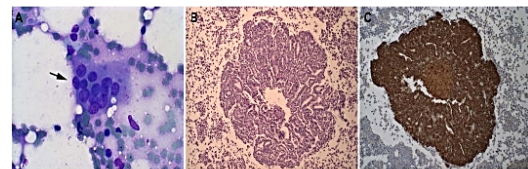


Figure 1: Representative Bone marrow photomicrographs: (A) Epithelial cell clusters in the smear are compatible with DTCs from inflammatory mammary carcinoma (see black arrow). Giemsa staining, obj. 10×. (B) Histopathology of canine bone marrow with the presence of epithelial cells in a cribriform tumor (H-E), obj. 20×. (C) Cytokeratin positive staining in epithelial cells present in canine bone marrow, counterstained in Harri's hematoxylin, obj. 20×.

All four dogs in this study died due to the evolution of the disease. Concerning overall survival time ranged from 3 to 20 days (median 16 days). The necropsy was performed in two animals, and BM samples were collected to histopathological and immunohistochemistry analyses for DTCs (Figure 1B and 1C). The BM samples were fixed in 10% neutral-buffered formalin for 48 h,

OPEN ACCESS

processed by the routine paraffin method, and stained with hematoxylin-eosin. The owners of the two other animals did not allow the necropsy. The BM squash previously performed was used for immunofluorescence (Figure 2). Immunofluorescence in bone marrow smear and paraffin-embedded tissue confirmed the epithelial cells subcellular localization with the cytokeratin staining. The number of animals, screening methods and the technique used for the diagnostic confirmation are presented in Table 2.

Table 2: The number of cases, the screening method, and the technique used to confirm the DTCs.

ANIMALS	SCREENING METHOD	DIAGNOSTIC CONFIRMATION
2	FNA	Immunofluorescence in BM squash
2	FNA	Histopathological and immunohistochemistry in BM paraffin block

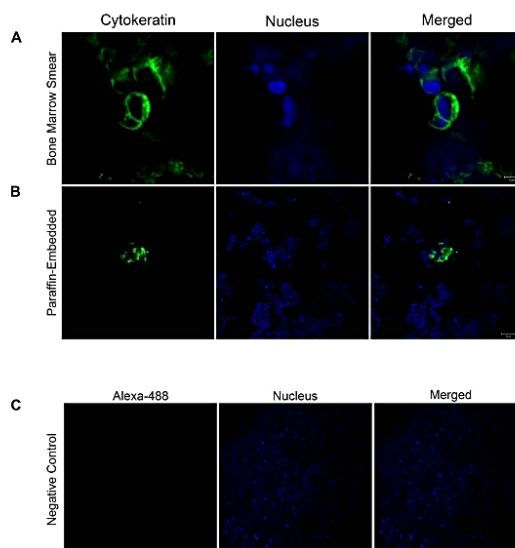


Figure 2: Cytokeratin localization confirmed by confocal microscopy: (A-B) Immunofluorescence images show in green cytokeratin localization in bone marrow smear and paraffin-embedded tissue (Scale Bars= 5 and 20 μ m). The nuclei were stained with Hoechst and are shown in blue. The merged images confirm the subcellular localization of cytokeratin. (C) Representative image of the negative control. Images are representative of what was observed in two independent experiments. Scale Bar: 20 μ m.

Our study describes the presence of DTCs coming from IMC in dogs. Previous studies showed the presence of micrometastases in BM in animals with apocrine adenocarcinoma of anal sac gland, apocrine carcinoma

of the skin, and presence of DTC's in no inflammatory mammary neoplasia (Jaillardon et al., 2012; Taylor et al., 2013). Some authors suggest that neoplastic cells affinity to BM is due to the hematopoietically substances active, which make the microenvironment favorable to its survival and latency. The presence of these cells in BM in women with breast cancer could explain the disease recurrence after a long period since standard cytotoxic agents are not active in resting cells. After the end of conventional chemotherapy treatment, the cells return to activate and migrate to new metastatic foci (Hu et al., 2017).

The presence of DTCs in BM is well established as a poor prognostic indicator to free-survival disease and overall survival in women's mammary cancer (Braun et al., 2005). We believe that the presence of DTCs in canine IMC does not change the prognosis because it is an aggressive and hyperacute course disease. Currently, studies are focused on the analysis of the DTCs as a clinical monitoring tool because of the increased risk of recurrence in patients with DTCs in BM. These patients could be benefited from additional treatment with adjuvant chemotherapy since conventional therapy does not work in these cells (Braun et al., 2005; Janni et al., 2011). Therefore, the identification of DTCs can lead to new therapeutic approaches to better control the disease and overall survival (Ito et al., 2012). In veterinary medicine, research related to DTC still scarce and insufficient to infer the influence on the prognosis in mammary carcinoma in dogs.

In this study, all animals presented advanced clinical staging. Previous work reported the presence of DTCs in patients with initial clinical-stage, so further studies are needed to establish the importance of DTCs in tumor progression. In veterinary medicine, the role of DTCs should be investigated in canine mammary neoplasms, since they may be an auxiliary, low invasive, and low-cost tool for understanding the progression of the disease.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from CNPq, FAPEMIG, and CAPES. The microscopic data shown in this work were obtained using the microscopes of "Centro de Aquisição e Processamento de Imagens" (CAPI -ICB/UFMG).

AUTHORS CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the study conception and design. Geovanni D. Cassali, Miriã R. de Oliveira, Tatiany L. Silveira, and Michele R. Rodrigues designed the experiments and wrote the paper. Miriã R. de Oliveira, Tatiany L. Silveira, and Michele R. Rodrigues performed the experiments. Geovanni D. Cassali, Rubens A. Carneiro,

OPEN ACCESS

and Gleidice E. Lavalle performed the cytopathological data analysis. All authors read and approved the final manuscript.

ETHICS APPROVAL

All procedures performed in studies involving animals were following the ethical standards and were approved by the Animal Research Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil (n° CEUA 200/2016).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Argyle D (2003). The molecular biology of cancer. In: BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology. pp. 1–9.
- Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K (2005). A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 353: 793–802. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050434>
- Cassali GD, Lavalle GE, Nardi a. B De, (Ghever C, Sobral RA, Amorin RL, Oliveira LO, Sueiro FAR, Beserra HEO, Bertagnolli AC, Gamba CO, Damasceno KA, Campos CB, Araujo MR, Campos LC, Monteiro LN, Nunes FC, Horta RS, Reis DC, Luvizotto MCR, Magalhaes GM, Raposo JB, Ferreira AMR, Tanaka NM, Grandi F, Ubukata R, Batschinski K, Terra EM, Salvador RCL, Jark PC, Delecrodi JER, Nascimento NA, Silva DN, Silva LP, Ferreira KCRS, Frehse MS, Di Santis GW, Silva EO, Guim TN, Kerr B, Cintra PP, Silva FBF, Leite JS, Mello MFV, Ferreira MLG, Fukumasu H, Salgado BS, Torres R. (2014). Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Braz. J. Vet. Pathol.* 4: 153–180.
- Elston CW, EIO (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 19: 403–410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>
- Goldschmidt MH, Peña L, Rasotto R, Zappulli V (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet. Pathol.* 48: 117–131. <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>
- Hu Y, Yu X, Xu G, Liu S (2017). Metastasis: An early event in cancer progression. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 143: 745–757. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2279-0>
- Ito Y, Iwase T, Hatake K (2012). Eradication of breast cancer cells in patients with distant metastasis: The finishing touches? *Breast Cancer.* 19: 206–211. <https://doi.org/10.1007/s12282-011-0266-5>
- Jaillardon L, Barthélemy A, Goy-Thollot I, Pouzot-Nevoret C, Fournel-Fleury C. (2012). Mammary gland carcinoma in a dog with peripheral blood and bone marrow involvement associated with disseminated intravascular coagulation. *Vet. Clin. Pathol.*, 41: 261–265. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2012.00433.x>
- Janni W, Vogl FD, Wiedswang G, Synnestvedt M, Fehm T, Jückstock J, Borgen E, Rack B, Braun S, Sommer H, Solomayer E, Pantel K, Nesland J, Friese K, Naume B. (2011). Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse. A European pooled analysis. *Clin. Cancer Res.*, 17: 2967–2976. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2515>
- Misdorp W, Else RW, Hellmen, Lipscomb TP (1999). Histological classification of mammary tumors of the dog and cat.
- Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmüller G (1993). Differential Expression of Molecules in Individual Carcinoma Cells U. In the present report, we used. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 1419–1424. <https://doi.org/10.1093/jnci/85.17.1419>
- Peña L, Perez-Alenza MD, Rodriguez-Bertos A, Nieto A (2003). Canine inflammatory mammary carcinoma: Histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Res. Treat.* 78: 141–148. <https://doi.org/10.1023/A:1022991802116>
- Rene Bernards, Weinberg RA (2002). A progression puzzle. *Nature.* 418: 823. <https://doi.org/10.1038/418823a>
- Rodrigues MA, Gamba CO, Faria JA, Ferreira Ê, Goes AM, Gomes DA, Cassali GD (2016). Inner nuclear membrane localization of epidermal growth factor receptor (EGFR) in spontaneous canine model of invasive micropapillary carcinoma of the mammary gland. *Pathol. Res. Pract.*, 212: 340–344. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.11.017>
- Taylor BE, Leibman NF, Luong R, Loar AS, Craft DM (2013). Detection of carcinoma micrometastases in bone marrow of dogs and cats using conventional and cell block cytology. *Vet. Clin. Pathol.* 42: 85–91. <https://doi.org/10.1111/vcp.12011>
- Zhao S, Liu Y, Zhang Q, Li H, Zhang M, Ma W, Zhao W, Wang J, Yang M. (2011). The prognostic role of circulating tumor cells (CTCs) detected by RT-PCR in breast cancer: A meta-analysis of published literature. *Breast Cancer Res. Treat.* 130: 809–816. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1379-4>

Análise das alterações hematológicas e bioquímicas em cadelas com neoplasias mamárias e Carcinoma Inflamatório.**RESUMO**

Alterações hematológicas e bioquímicas podem resultar dos efeitos diretos do crescimento do tumor ou de síndromes paraneoplásicas, sendo frequentemente encontradas em animais portadores de neoplasias, O objetivo desse estudo foi avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas em cadelas portadoras de neoplasias mamárias de acordo com o estadiamento clínico inicial, avançado e com Carcinoma Inflamatório (CI). Foram coletadas amostras de sangue de 43 cadelas divididas em três grupos de acordo com o estadiamento clínico: Grupo 1 (G1): cadelas em estadio clínico inicial ($T_{1,2,3}N_0M_0$ - N=17), Grupo 2 (G2) - cadelas em estadio clínico avançado ($T_{1,2,3}N_1M_{0,1}$ - N=15) e Grupo 3 (G3): cadelas que apresentaram CI (N=11). Os parâmetros hematológicos e bioquímicos obtidos foram relacionados com o estadiamento clínico das pacientes, dentre eles, os mais comuns foram anemia, leucocitose neutrofílica, monocitose, aumento de ALT, AST e hipoalbuminemia, respectivamente, principalmente em cadelas em estadiamento clínico avançado e com carcinoma inflamatório.

Palavras-chave: Cadelas, neoplasias mamárias, alterações hematológicas, alterações bioquímicas.

ABSTRACT

Hematological and biochemical changes can result from the direct effects of tumor growth or paraneoplastic syndromes, and are frequently found in animals with neoplasms. The aim of this study was to evaluate the hematological and biochemical changes in bitches with breast cancer according to the clinical stage. initial, advanced clinical and with Inflammatory Carcinoma (IC). Blood was collected from 43 bitches divided into three groups according to clinical stage: Group 1 (G1): bitches in initial clinical stage ($T_{1,2,3}N_0M_0$ - N = 17), Group 2 (G2) - bitches in advanced clinical stage ($T_{1,2,3}N_1M_{0,1}$ - N = 15) and Group 3 (G3): bitches that separate CI (N = 11). The hematological and biochemical parameters were related to the clinical staging of patients, among them, the most common were anemia,

neutrophilic leukocytosis, monocytosis, increased ALT, AST and hypoalbuminemia, respectively, mainly in bitches in clinical staging and with advanced carcinoma

INTRODUÇÃO

Síndromes paraneoplásicas (SPN) correspondem a um grupo diverso de alterações clínicas que ocorrem em sítios distantes dos tumores primários ou de suas metástases, podendo ser tão prejudicial quanto à causa inicial. Em alguns casos, as SPN representam o primeiro sinal clínico sendo observada antes do diagnóstico de uma neoplasia. A incidência de SPN em medicina veterinária é pouco descrita, porém na medicina estima-se que e 75% dos pacientes com câncer apresentam alterações paraneoplásicas durante a evolução da neoplasia (Morrison, 2002).

Efeitos diretos do crescimento do tumor ou de síndromes paraneoplásicas podem resultar em alterações hematológicas, as quais são frequentemente encontradas em animais de companhia portadores de neoplasias (Childress, 2012). Sabe-se que as manifestações hematológicas mais comumente observadas são anemia, leucocitose, trombocitopenias e coagulopatias (Stockhaus *et al.*, 1999; Bergman, 2013). A anemia relacionada ao câncer é uma complicação comum em pacientes humanos com vários tipos de tumores e podem ter um impacto negativo sobre a qualidade de vida, prognóstico e resposta ao tratamento (Blohmer, *et al.*, 2005). Além disso, diversas anormalidades bioquímicas foram descritas nos pacientes oncológicos, entre elas hipercalcemia, hipoglicemia, hipoproteinemia e elevação da fosfatase alcalina total e de suas isoenzimas correspondentes (Karayannopoulou, *et al.*, 2006; Bergman, 2013).

Em medicina humana as alterações hematológicas são consideradas um importante fator determinante de prognóstico em pacientes com neoplasias. Contudo, em medicina veterinária essas alterações e sua associação com neoplasias mamárias são pouco exploradas. Identificar uma síndrome paraneoplásica permite o diagnóstico precoce da neoplasia, melhorando o prognóstico e a qualidade de vida do paciente. Estudos de associação entre alterações hematológicas e bioquímicas com a progressão de doença em neoplasias mamárias caninas são escassos (Silva *et al.*, 2014; Garrido *et al.*, 2015). Além disso, nenhum estudo avaliou a associação dessas alterações com progressão tumoral em cadelas com carcinoma inflamatório. Assim sendo, o objetivo desse estudo foi avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas em cadelas portadoras de neoplasias mamárias malignas de acordo com o estadiamento clínico e com carcinoma inflamatório.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

O uso de animais e procedimentos para este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 200/2016).

Seleção dos casos

Foram incluídas no presente estudo 43 cadelas com neoplasias mamárias malignas atendidas no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário (SOV-HV) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os critérios de inclusão foram cadelas sem predileção de raça ou idade, com neoplasias mamárias ou com carcinoma inflamatório (CI) atendidas no período entre março de 2015 e janeiro de 2018. Foram considerados como sinais clínicos característicos de CI a presença de massa associada edema, hipertermia e eritema nas glândulas mamárias. Foram excluídas do estudo, pacientes com diagnóstico sorológico de leishmaniose, hemoparasitoses ou que foram vacinadas em um prazo inferior a quatro meses.

As variáveis de interesse clínico e epidemiológico como idade, status reprodutivo, tamanho do tumor e tipo histológico foram obtidas por meio de prontuários eletrônicos presentes nos arquivos digitais do HV-UFMG.

Coleta de sangue

A coleta das amostras de sangue foi realizada anteriormente à exérese cirúrgica como exame auxiliar para o risco cirúrgico. Para as pacientes com CI a coleta de sangue foi realizada no momento do diagnóstico clínico. Todas as pacientes foram submetidas à venopunção a vácuo das veias jugulares externas, cefálicas ou safenas laterais, após antissepsia adequada do local, com auxílio de agulha e seringa de 5 ml. Foram utilizados tubos com anticoagulante etilenodiaminotetracético dipotássico (EDTA-K2) para hemograma e tubos sem anticoagulante, para análises bioquímicas. As análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do HV- UFMG.

Análise do hemograma e perfil bioquímico

O hemograma foi realizado pelo analisador hematológico Veterinário Icounter Vet pelo método de impedância, que fornece a contagem automática de leucócitos totais, basófilos, eosinófilos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, hemácias, volume globular (VG), plaquetas, concentração de hemoglobina e volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média, hemoglobina corpuscular média. O VG foi avaliado, também, pelo microhematócrito, centrifugado por cinco minutos a 10000 rpm para comparação com o resultado automático. O grau de anemia foi classificado pelo valor do VG, em que percentuais entre 30 e 37% indicaram anemia discreta, entre 20 e 29% anemia moderada, entre 13 e 19% anemia acentuada e abaixo de 13% anemia muito acentuada. A contagem diferencial de leucócitos, realizada a partir da contagem de 100 células, e a análise citomorfológica foi realizada em microscopia óptica, em objetivas de 20X, 40X e 100x, utilizando esfregaços sanguíneos corados em Panótico. Contagens plaquetárias automáticas foram conferidas a partir da observação em lâmina contando-se a média em dez campos de 100X, com posterior multiplicação por 20000. Os valores de referência seguem o proposto por Jain (1993).

O perfil bioquímico foi realizado, a partir do soro obtido após a centrifugação do sangue armazenado em tubos contendo ativador de coagulação, em Analisador Bioquímico Cobas Mira 5. As análises bioquímicas, utilizando kits comerciais da Synermed, incluíram proteína total e frações, pelo método colorimétrico, creatinina, pelo método cinético, uréia, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA), pelo método enzimático. Os valores de referência seguidos foram propostos por Kaneko *et al.* (1997).

Estadiamento clínico

Todas as pacientes foram submetidas a estudo radiográfico do tórax em três incidências (ventro-dorsal, latero-lateral direita e esquerda) e ultrassom abdominal para estadiamento clínico. O sistema utilizado foi o TNM estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o qual leva em consideração o tamanho do tumor primário (T), envolvimento de linfonodos regionais (N) e metástases em órgãos distantes (M). A presença de metástases nos linfonodos axilares ou inguinais foi confirmada histologicamente após exérese cirúrgica da glândula mamária envolvida, sendo a presença de células isoladas, de

micro ou macrometástases o critério de positividade para envolvimento nodal. De acordo com o sistema TNM as pacientes foram classificadas em estádios de I a V conforme Tab. 1.

Tabela 1 - Sistema de estadiamento clínico para tumores mamários caninos de acordo com o sistema TNM estabelecido pela Organização Mundial da Saúde, adaptado por Sonremo et al., (2013).

Estadiamento	Tamanho (T)	Linfonodos regionais (N)	Metástases distantes (M)
I	T ₁	N ₀	M ₀
II	T ₂	N ₀	M ₀
III	T ₃	N ₀	M ₀
IV	T _{1,2,3} Carcinoma Inflamatório	N ₁	M ₀
V	T _{1,2,3}	N _{0,1}	M ₁

Estadiamento clínico para tumores mamários caninos: T = tamanho do tumor primário, onde T₁ < 3,0cm de diâmetro; T₂ = 3,0 – 5,0cm de diâmetro; T₃ > 5,0cm de diâmetro. N = envolvimento de linfonodos regionais, onde N₀ = sem evidência de metástases; N₁= linfonodos regionais ipsilaterais envolvidos; M=metástases em órgãos distantes ou linfonodos que não drenam as cadeias mamárias, onde M₀ = sem evidências de metástases à distância, M₁= presença de metástases à distância (Adaptado de Owen, 1980).

Exceto para as pacientes com CI, todas as cadelas passaram por exérese cirúrgica como terapia inicial para as neoplasias mamárias. As mastectomias foram realizadas de acordo com o número, tamanho e localização dos tumores, respeitando os princípios da cirurgia oncológica e drenagem linfática da cadeia mamária (Horta *et al.*,2014). As amostras ressecadas cirurgicamente foram imersas em solução aquosa de formalina tamponada a 10% e encaminhados para análise histopatológica. Secções histológicas de 4 µm foram obtidas dos fragmentos mamários provenientes da exérese cirúrgica ou de material de necropsia de cadelas que vieram a óbito devido ao carcinoma inflamatório. Todas as amostras foram processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina e coradas pela técnica da Hematoxilina-Eosina. A identificação do tipo histológico seguiu a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Misdorp *et al.*, 1999) e padronização de acordo com Cassali *et al.* (2014). As cadelas foram acompanhadas por um período de 2 anos ou até o momento do óbito.

Análise estatística

As comparações entre os grupos e as alterações hematológicas e bioquímicas foram realizadas pelo teste global de Kruskal-Wallis, os valores foram considerados estatisticamente significativos quando P<0,05. Os valores de referência de hemograma e bioquímica da espécie foram utilizados como controle de acordo com Kaneko *et al.*, (1997) e Jain *et al.*,

(1993). Além disso, as alterações hematológicas e bioquímicas foram correlacionadas com o estadiamento clínico e com presença de carcinoma inflamatório. Assim sendo, três grupos distintos foram incluídos: Grupo 1 (G1): cadelas em estadio clínico inicial ($T_{1,2,3}N_0M_0$ - N=17), Grupo 2 (G2) - cadelas em estadio clínico avançado ($T_{1,2,3}N_1M_{0,1}$ - N=15) e Grupo 3 (G3): cadelas que apresentaram CI (N=11).

RESULTADOS

Dados clínicos e patológicos

A idade média ao diagnóstico foi aos $10,82 \pm 2,86$ anos (mínima aos 06 anos e máxima aos 15,5 anos). A maioria (71%) não era castrada no momento do diagnóstico e nas demais pacientes a esterilização ocorreu tardiamente, após o terceiro cio, segundo Schneider (1969). O tipo histológico mais frequente foi carcinoma micropapilar, seguido de carcinoma em tumor misto e carcinoma papilar, conforme Tab. 2.

Tabela 2 - Características clínico-patológicas de cadelas com neoplasias mamárias em estadio inicial, avançado e CI.

VARIÁVEIS	GRUPO 1 ($T_{1,2,3}N_0M_0$)	GRUPO 2 ($T_{1,2,3}N_1M_{0,1}$)	GRUPO 3 (CI)	TOTAL
N	17(39,53%)	15 (34,88%)	11(25,58%)	43 (100%)
Idade média \pm DP	8,76 \pm 3,34	11,94 \pm 1,94	11,76 \pm 3,30	10,82 \pm 2,86
Status reprodutivo				
Castradas	0 (0%)	6(46,15%)	6 (54,55%)	12 (29,27%)
Não castradas	17(100%)	7(53,85%)	5 (45,45%)	29(70,73%)
Tipo histológico				
Carcinoma Micropapilar	0 (0%)	2 (13,33%)	6 (54,55%)	8 (18,60%)
Carcinoma Sólido	0 (0%)	3 (20%)	0 (0%)	3 (6,98%)
Carcinoma lobular pleomórfico	0 (0%)	2 (13,33%)	2 (18,18%)	4 (9,30%)
Adenomioepitelioma Maligno	1 (5,88%)	1 (6,66%)	0 (%)	2 (4,65%)
Carcinoma Cribriforme	0 (0%)	0 (%)	1 (9,09%)	1 (2,32%)
Carcinoma Papilar	3 (17,65%)	1 (6,67%)	2 (18,18%)	6 (13,95%)
Carcinoma em Tumor Misto	13 (76,47%)	3 (20%)	0 (%)	16 (37,21%)
Carcinossarcoma	0 (0%)	2 (13,33%)	0 (%)	2 (4,65%)
Osteossarcoma	0 (%)	1 (6,67%)	0 (%)	1 (2,32%)

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos de acordo com os grupos e os valores de referência para a espécie estão descritos nas Tab. 3 e 4, respectivamente. A anemia foi a

alteração hematológica mais frequente observada em cadelas do grupo G2 (T_{1,2,3}N₁M_{0,1}) e grupo G3 (CI), correspondendo a 53,8% dos casos (14/26) Quanto ao tipo, 71,43% (10/14) das anemias foram classificadas como normocítica normocrômica e quanto ao grau, 57,14% (8/14) das cadelas apresentaram anemia discreta e 35,71% (5/14) anemia moderada de acordo com os valores de VG. Observou-se nas pacientes do grupo G2 (T_{1,2,3}N₁M_{0,1}) e grupo G3, leucocitose neutrofílica, indicando a presença de processo inflamatório.

Foram observadas alterações bioquímicas nas enzimas ALT entre os grupos G1 (T_{1,2,3}N₀M₀) e G2 (T_{1,2,3}N₁M_{0,1}) e AST entre os grupos G1 (T_{1,2,3}N₀M₀) e G2 (T_{1,2,3}N₁M_{0,1}) e entre os grupos G1 (T_{1,2,3}N₀M₀) e G3 (CI).

Tabela 3. Valores hematológicos de cadelas com neoplasias mamárias de acordo com o estadiamento clínico e carcinoma inflamatório.

PARÂMETRO	GRUPO 1 (T_{1,2,3}N₀M₀)	GRUPO 2 (T_{1,2,3}N₁M_{0,1})	GRUPO 3 (CI)	VALORES DE REFERÊNCIA (unidade)
VG	43,6 ± 6,7	36,4 ± 8,7	32,5 ± 6,3	37-55 (%)
HB	15,2 ± 2,3	13,0 ± 3,6	10,7 ± 2,6	12 a 18 (g/dL)
HEMÁCIAS	6,6 ± 0,9	5,5 ± 1,4	4,8 ± 1,0	5.5-8.5 (10 ⁶ /μL)
VCM	66,6 ± 5,3	66,8 ± 4,4	68,4 ± 4,6	60-77 (fL)
CHCM	34,4 ± 3,1	35,4 ± 2,7	32,8 ± 2,4	31-36 (g/dL)
HCM	23,7 ± 3,1	23,6 ± 2,4	22,4 ± 1,7	19-24.5 (pg)
RDW	13,5 ± 1,2	12,8 ± 1,0	14,6 ± 2,3	12 a 15 (%)
LEUCÓCITOS TOTAIS (x10³)	9,1 ± 3,2	18,9 ± 9,6	25,8 ± 22,7	6-17 (x10 ³ /μL)
NEUTRÓFILOS	6761 ± 2490	15825 ± 8677	21546 ± 7958	3-11,5 (x10 ³ /μL)
BASTONETES	27,1 ± 56,2	117,4 ± 259,0	668,9 ± 1710,9	0-300 (/μL)
LINFÓCITOS	1423 ± 895	1486 ± 1006	1269 ± 993	1-4,8 (x10 ³ /μL)
MONÓCITOS	452 ± 238	915 ± 902	1895 ± 2284	0,15-1,35 (x10 ³ /μL)
EOSINÓFILOS	443 ± 346	318 ± 476	356 ± 506	0,1-1,25 (x10 ³ /μL)
PLAQUETAS (x10³)	324 ± 132	385 ± 343	256 ± 265	200 – 500 (x10 ³ /μL)

Dados expressos em média com seu respectivo desvio padrão. VG = Volume globular, HB = Hemoglobina, VCM = Volume corpuscular médio, CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média, HCM = Hemoglobina Corpuscular Média, RDW = Red Cell Distribution Width (Distribuição dos Glóbulos Vermelhos).

Tabela 4. Valores bioquímicos de cadelas com neoplasias mamárias de acordo com o estadiamento clínico e carcinoma inflamatório.

PARÂMETRO	GRUPO 1 (T _{1,2,3} N ₀ M ₀)	GRUPO 2 (T _{1,2,3} N ₁ M _{0,1})	GRUPO 3 (CI)	VALORES DE REFERÊNCIA (unidade)
ALT	55,8 ± 32,1	175,5 ± 229,6	74,2 ± 47,4	0-110 (U/L)
AST	30,6 ± 10,3	779,9 ± 205,7	1348,6 ± 436,6	0-100 (U/L)
FA	61,7 ± 63,2	39,2 ± 26,2	115,0 ± 156,9	20-156 (U/L)
URÉIA	32,8 ± 8,8	42,4 ± 33,3	47,9 ± 52,5	20-56 (mg/dL)
CREATININA	0,9 ± 0,2	0,83 ± 0,27	1,21 ± 0,55	0.5-1.5 (mg/dL)
PROTEÍNAS TOTAIS	6,7 ± 1,4	6,3 ± 0,8	5,9 ± 1,0	5.4-7.5 (g/dL)
ALBUMINA	3,0 ± 0,5	2,3 ± 0,5	2,6 ± 0,6	2.3-3.1 (g/dL)
GLOBULINA	3,8 ± 1,6	4,1 ± 1,0	3.3 ± 1,1	2.7-4.4 (g/dL)

Dados expressos em média e desvio padrão. ALT = alanina aminotransferase, AST = aspartato aminotransferase e FA = fosfatase alcalina

A análise do eritograma demonstrou diferença significativa nos valores das hemácias ($P < 0.001$) e hemoglobina ($P < 0.01$) entre o grupo G1 (T_{1,2,3}N₀M₀) e o grupo G3 (CI) respectivamente, (Fig. 1A e 1B). Houve também diferença significativa quando comparado os valores de hematócrito entre o grupo G1 (T_{1,2,3}N₀M₀) e o grupo G2 (T_{1,2,3}N₁M_{0,1}) e entre o grupo G1 (T_{1,2,3}N₀M₀) e o grupo G3 (CI), respectivamente, caracterizando anemia.

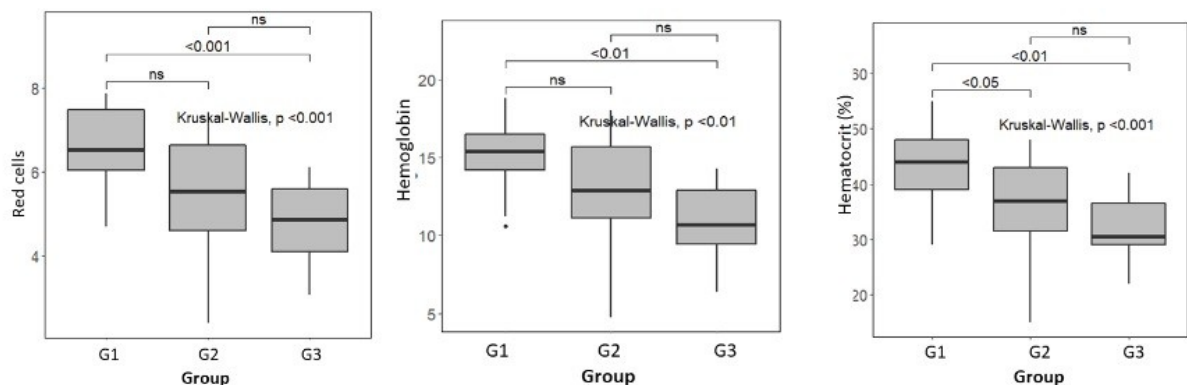


Figura 1. Boxplot de hemácias, hemoglobina e hematócrito de acordo com os grupos. As partes superior e inferior da caixa indicam os quartis superior e inferior, respectivamente, a linha horizontal representa o valor mediano e a linha vertical passa do valor mínimo para o valor máximo; o ponto representa os valores discrepantes. Significância obtida pelo teste de Kruskal-Wallis.

A análise do leucograma demonstrou diferença significativa nos valores de leucócitos totais entre o grupo G1- (T_{1,2,3}N₀M₀) e o grupo G2- (T_{1,2,3}N₁M_{0,1}) ($p < 0,001$) e entre o G1- (T_{1,2,3}N₀M₀) e o grupo G3 - CI ($p < 0,05$). Houve também diferença significativa de neutrófilos

segmentados entre o grupo G1- ($T_{1,2,3}N_0M_0$) e o grupo G2- ($T_{1,2,3}N_1M_{0,1}$) ($p < 0,001$) e entre os grupos G1- ($T_{1,2,3}N_0M_0$) e o grupo G3 -CI ($p < 0,05$), caracterizando um quadro de leucocitose neutrofílica (Fig. 2A e B).

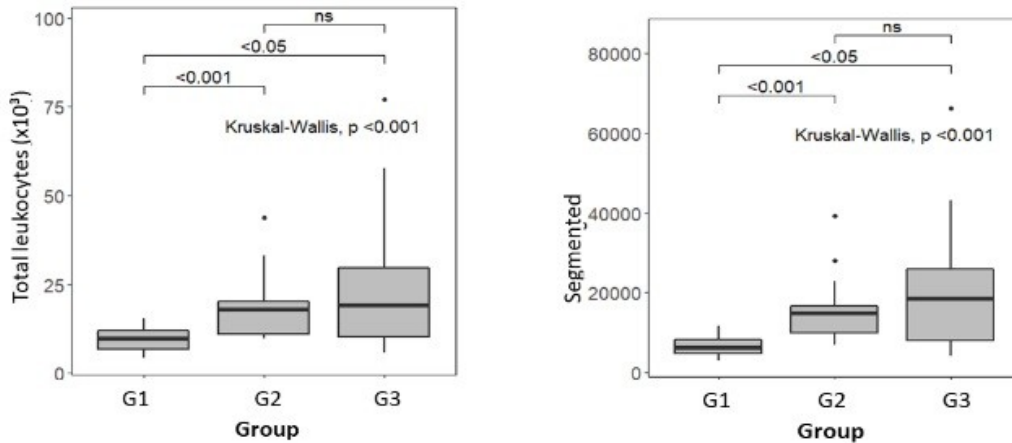


Figura 2. Boxplot de leucócitos totais e segmentados de acordo com os grupos. As partes superior e inferior da caixa indicam os quartis superior e inferior, respectivamente, a linha horizontal representa o valor mediano e a linha vertical passa do valor mínimo para o valor máximo; o ponto representa os valores discrepantes. Significância obtida pelo teste de Kruskal-Wallis

A análise do perfil bioquímico demonstrou diferença significativa nos valores de ALT entre o grupo G1 e o grupo G2 ($p < 0,05$), AST entre o grupo G1 ($T_{1,2,3}N_0M_0$) e o grupo G2 ($T_{1,2,3}N_1M_{0,1}$) ($p < 0,0001$) e entre o grupo G1 ($T_{1,2,3}N_0M_0$) e o grupo G3 (CI) ($p < 0,01$) e albumina entre o grupo G1 ($T_{1,2,3}N_0M_0$) e o grupo G2 ($T_{1,2,3}N_1M_{0,1}$) ($p < 0,01$) (Fig. 3).

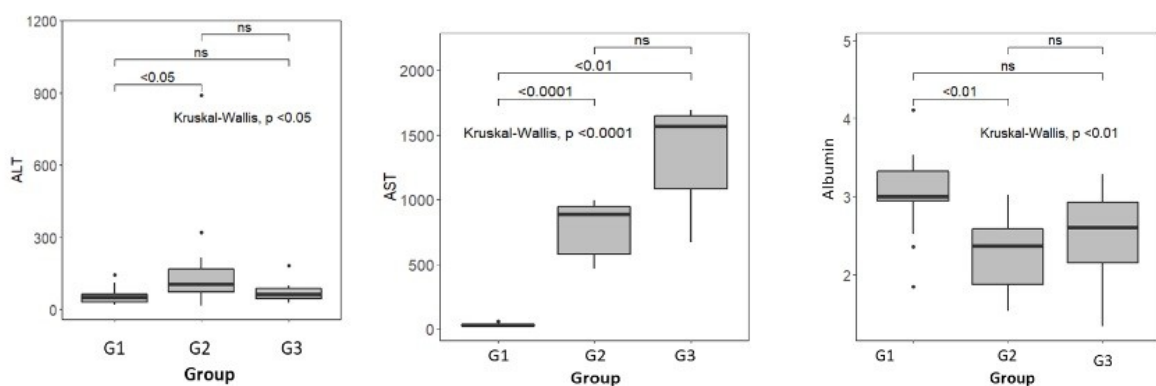


Figura 3. Boxplot de ALT, AST e albumina de acordo com os grupos. As partes superior e inferior da caixa indicam os quartis superior e inferior, respectivamente, a linha horizontal representa o valor mediano e a linha vertical passa do valor mínimo para o valor máximo; o ponto representa os valores discrepantes. Significância obtida pelo teste de Kruskal-Wallis.

DISCUSSÃO

A anemia apresentada pelas cadelas com doença avançada (G2) e com CI (G3) era frequente e corrobora com estudos anteriores que a associaram à progressão tumoral (Silva *et al.*, 2014). A anemia do tipo normocítica normocrômica é característica de anemia da doença crônica ou da inflamação, e seu mecanismo está associado à secreção tumoral de citocinas responsáveis por promover sequestro de ferro, redução da meia vida das hemácias e da secreção de eritropoietina (Cançado e Chiattonne, 2002; Mangieri, 2009; Silva *et al.*, 2014).

A leucocitose neutrofílica é um achado comum em animais com CI, essa alteração pode ser justificada pela infecção e processo inflamatório presentes nas mamas caracterizados pelo inchaço, secreção e vermelhidão ou por necrose associada ao tumor (Campos *et al.*, 2006; Childress, 2012; Ribeiro *et al.*, 2013).

A leucocitose neutrofílica, acompanhada de níveis normais de células mononucleares, foi considerado o mais importante achado hematológico em cães acometidos por carcinomas mamários e a presença de neutrófilos no infiltrado inflamatório está relacionado a um prognóstico ruim, uma vez que animais que apresentaram tumores maiores, metástases e casos que evoluíram até a morte apresentaram valores mais altos desta célula (Estrela-lima *et al.*, 2012). O presente estudo sugere que a animais que apresentam neoplasias mamárias em estadiamento avançado e CI associado à leucocitose neutrofílica indicam pior prognóstico, porém, mais estudos são necessários para concluir que a leucocitose neutrofílica se comporta como fator prognóstico em cadelas com neoplasias mamárias.

A Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) pode ser definida como manifestação clínica da resposta inflamatória sistêmica e decorre do desequilíbrio entre citocinas anti-inflamatória e inflamatórias. Para ser caracterizado como SIRS o animal deve apresentar pelo menos dois parâmetros clínicos alterados, dentre eles frequência respiratória acima de 20 movimentos por minuto, temperatura retal menor que 38,1°C ou maior que 39,2°C, leucócitos totais inferiores a $6 \times 10^3/\text{mm}^3$, superiores a $16 \times 10^3/\text{mm}^3$ ou bastonetes superiores a 3% (Silverstein e Sanotoro-beer, 2013). Em 2016, foi descrito o primeiro caso de SRIS em uma mulher portadora de CI e relatou-se que, tal condição dificultou o manejo da doença e contribuiu para o desfecho negativo do quadro (Boshier *et al.*, 2016). Na medicina veterinária, ainda não há relatos associando essas duas morbidades tão pouco seus desdobramentos, porém, acreditamos que as cadelas com doença avançada, assim como CI são propensas ao desenvolvimento dessa síndrome, pois nesse estudo foi visto que apresentam

o quadro de leucocitose, no entanto os outros parâmetros para seu diagnóstico não foram mensurados.

Stockham e Scott (2011) afirmam que uma das causas de aumento das enzimas ALT e AST é lesão muscular esquelética. As alterações de tais enzimas observadas no estudo presente estudo podem estar relacionadas às lesões musculares induzidas pela neoplasia na musculatura abdominal desses animais.

Quanto à análise da albumina, houve diferença entre o grupo G1 e o grupo G2 caracterizando um quadro de hipoalbuminemia relativa, Além disso, por se tratar de uma proteína de fase aguda, a albumina tende a reduzir seus níveis séricos sob estímulos inflamatórios (Cerón *et al.* 2005).

Anemia, leucocitose neutrofilica, monocitose, aumento de ALT, AST e hipoalbuminemia foram as alterações hematológicas e bioquímicas mais frequentes encontradas em cadelas com neoplasias mamárias em estadiamento clínico inicial, avançado e CI. Percebemos que essas alterações se tornam mais pronunciadas à medida que a doença evolui, ou seja, se podem se comportar como marcadores de progressão tumoral. Essas alterações são decorrentes de síndromes paraneoplásicas ou de efeito direito do tumor e a análise dessas alterações é importante, pois podem representar impacto negativo sobre a qualidade de vida, prognóstico, tratamento e sobrevida das pacientes. Podemos perceber também, que as alterações hematológicas e bioquímicas supracitadas são mais acentuadas em cadelas que apresentam CI, o que contribui para seu pior prognóstico levando esses animais a apresentarem alterações sistêmicas.

CONCLUSÃO

Anemia, leucocitose neutrofilica, monocitose, aumento de ALT, AST e hipoalbuminemia foram as alterações hematológicas e bioquímicas mais frequentes encontradas em cadelas com neoplasias mamárias em estadiamento clínico inicial, avançado e CI. Essas alterações podem se comportar como marcadores de progressão tumoral e suas análises são importantes, pois podem representar impacto negativo sobre a qualidade de vida, prognóstico, tratamento e sobrevida das pacientes.

REFERÊNCIAS

BERGMAN, PJ. Paraneoplastic Syndromes. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. Small Animal

Clinical Oncology. 2013. p.83-97

BLOHMER, J; DUNST J, HARRISON L, *et al.* Cancer-related anemia: Biological findings, clinical implications and impact on quality of life. *Oncology.*, V.68, p.12–21, 2005.

BOSHIER, RP; SAYERS, R; HADJIMINAS, DJ. *et al.* Systemic inflammatory response syndrome in a patient diagnosed with high grade inflammatory triple negative breast cancer: a case report of a potentially rare paraneoplastic syndrome. *Exp Hematol Oncol.* V.5, 6p,2016.

CAMPOS, L. C.; LAVALLE, G. E. ; CARNEIRO, R. A. *et al.* Carboplatina e inibidor de Cox-2 no tratamento do carcinoma inflamatório de mama em cadela – relato de caso. *Clínica Veterinária.* V. 92, p. 72-76, 2011.

CANÇADO,RD. & CHIATTONE, CS. Anemia da doença crônica.*Rev.bras.hematol.hemoter.*, V.24, p.127-136, 2002.

CASSALI, GD; LAVALLE, GE; FERREIRA, E. *et al.* Consensus for the diagnosis prognosis and treatment of canine mammary tumors. In *Braz J Vet Pathol.*, V.10, p.87-99, 2014.

CERÓN JJ; ECKERSALL P.D; MARTÍNEZ-SUBIELA S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet. Clin. Pathol.* V.34, p.85-99, 2005.

CHILDRESS, MO. Hematologic Abnormalities in the Small Animal Cancer Patient. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice.*V.42, p.123–155, 2012.

ESTRELA-LIMA, ADS; ARAÚJO, MSS; NETO, JMC. *et al.* Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers. *Breast Cancer Res. Treat.* V.131, p.751-763, 2012.

GARRIDO, E; CASTANHEIRA, TLL; VASCONCELOS, RDO. *et al.* Alterações hematológicas em cadelas acometidas por tumores mamários. *PubVet.* V.9, p. 291-297, 2015.

HORTA, RDS; LAVALLE, GE; CUNHA, RMDC, *et al.* Influence of Surgical Technique on Overall Survival, Disease Free Interval and New Lesion Development Interval in Dogs with Mammary Tumors. *Advances in Breast Cancer Research.* V.03, p. 38-46, 2014.

JAIN, NC. Comparative hematology of common domestic animals. In: *Essentials of veterinary hematology.* 1993. 417p.

KANEKO JJ; HARVEY JW; BRUSS ML 1997. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 1997. 932p.

- KARAYANNOPOULOU, M; POLIZOPOULOU, ZS; KOUTINAS, AF. *et al.* Serum alkaline phosphatase isoenzyme activities in canine malignant mammary neoplasms with and without osseous transformation. *Veterinary Clinical Pathology*. V.35, p. 287–290, 2006.
- MANGIERI, J. *Síndromes Paraneoplásicas*. In: DALECK, CR; DE NARDI, A.B; RODASKI, S. *Oncologia em cães e gatos*. 2009, p.238-249.
- MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T. P. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. 2nd Series. v. VII. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, 1999. p. 1-59.
- MORRISON, WB. Paraneoplastic syndromes and the tumors that cause them. In: MORRISON, W.B. *Cancer in dogs and cats*. p.731-743, 2002.
- OWEN LN. THE TNM Classification of tumors in domestic animals. World Health Organization.1980, 52p. RIBEIRO, LGR; LIMA, AE; COSTA-NETO, JM. *et al.* Carcinoma inflamatório de mama com metástase intracraniana em cadela - relato de caso. *Clínica Veterinária*. V.103, p. 82-90, 2013.
- SCHNEIDER, R; DORN, CR; TAYLOR, DO. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J. Natl. Inst.* V.43, p.1249-1261, 1969.
- SILVA, AHCD; SILVA, DMD; RIBAS, CR. *et al.* Alterações no hemograma de cadelas com neoplasia mamária. *Ciência Animal Brasileira*. V.15, p.87–92, 2014.
- SILVERSTEIN, D. e SANTORO-BEER, K. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), In: Rabelo R. *Emergências de Pequenos Animais: condutas clínicas e cirúrgicas no paciente grave*. 2013, p.316-321.
- SORENMO, K.U.; DEANNA, R.W.; GOLDSMIDT, R.H. Tumors of the mammary gland. In WITHROW, S.J., VAIL DM. *Withrow & MacEwen's Small animal clinical oncology*. 2013, p. 553-571.
- STOCKHAM, SL; SCOTT, A; Enzimas. In: *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. 2002, p.533-588.
- STOCKHAUS, C; KOHN, B; RUDOLF, R. *et al.* Correlation of haemostatic abnormalities with tumour stage and characteristics in dogs with mammary carcinoma. *Journal of Small Animal Practice*. V.40, p. 326–331, 1999.

8. CONCLUSÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos nesse estudo, nas condições metodológicas empregadas, podemos concluir que:

As neoplasias mamárias caninas se disseminam sob a forma de células disseminadas do tumor e se implantam na medula óssea como sítio metastático em cadelas com estadiamento clínico avançado e com carcinoma inflamatório de mama.

A anemia discreta do tipo normocítica normocrômica hiporregenerativa, leucocitose neutrofílica com desvio à esquerda e monocitose foram as alterações hematológicas mais frequentes encontradas em cadelas portadoras de neoplasias mamárias em estadiamento clínico avançado e carcinoma inflamatório de mama.

O aumento de AST e FA foram as alterações bioquímicas mais frequentes encontradas em cadelas portadoras de neoplasias mamárias em estadiamento clínico avançado e carcinoma inflamatório de mama.

A presença de CTD's em medula óssea não foi causa das alterações hematológicas e bioquímicas encontradas nas cadelas do estudo.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As neoplasias mamárias caninas são as neoplasias mais frequentes nas fêmeas dessa espécie, por isso representam grande importância para a medicina veterinária e é o foco do nosso grupo de pesquisa, assim como o carcinoma inflamatório de mama, que apesar de haver muitos estudos a respeito ainda é representa um grande desafio para o oncologista veterinário devido à sua agressividade e baixa sobrevida relacionada.

No presente estudo encontramos células tumorais disseminadas em medula óssea de cadelas com neoplasias mamárias em estadiamento clínico avançado e com carcinoma inflamatório de mama, nunca antes relatado na literatura veterinária. Tendo como base a literatura médica, podemos inferir a importância que esse achado representa a esses animais, uma vez que representa uma forma de disseminação tumoral.

A disseminação dessas células ocorre precocemente e elas permanecem latentes durante todo desenvolvimento do tumor e podem sair desse estado após longos períodos de tempo levando ao aparecimento de focos metastáticos. Os grupos analisados nesse estudo são de cadelas que apresentaram metástase, principalmente as cadelas com CIM, diante dessa informação questionamos se as DTC's encontradas poderiam ter sido responsáveis por algum desses focos metastáticos?

Essas células apresentam valor preditivo? Os animais que apresentam CTD's em MO são candidatas à terapia complementar com drogas antiangiogênicas por um período maior?

As cadelas que apresentam CTD's em MO possuem um prognóstico desfavorável quando comparadas às que não apresentam? Apresentam sobrevida menor?

Vimos também que as cadelas apresentaram alterações hematológicas e bioquímicas, essas alterações são capazes de piorar o estado clínico do animal, por isso, é importante que cada paciente seja avaliado individualmente para que se estabeleça uma terapia que possa oferecer melhora em sua qualidade de vida.

A presença dessas CTD's em MO ou de seus produtos, podem ser responsáveis por levar o animal a apresentar alterações hematológicas?

10. PERSPECTIVAS FUTURAS

A presença das CTD's em MO de cadelas com neoplasias mamárias gera um vasto campo a ser pesquisado. Estudos complementares, com maior número de animais e em estadiamentos clínicos iniciais e avançados são necessários para avaliar a presença dessas células e associá-las com fatores prognósticos já estabelecidos.

11. REFERÊNCIAS

- ABBO, A. H.; LUCROY, M.D. Assessment of anemia as an independent predictor of response to chemotherapy and survival in dogs with lymphoma: 96 cases (1993-2006). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 231 (12), p.1836-1842, 2007
- AKINBAMI, A.; POPOOLA, A.; ADEDIRAN, A. *et al.*, **Full blood count pattern of pre-chemotherapy breast cancer patients in Lagos, Nigeria**. *Caspian J Intern Med*. 2013 Winter; 4(1): 574–579
- ALENZA, M. D. P.; TABANERA, E.; PENA, L. **Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999)**. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 219, n. 8, p. 1110–1114, 2001.
- ALIUSTAOGU, M. *et al.* **The effect of peripheral blood values on prognosis of patients with locally advanced gastric cancer before treatment**. *Medical Oncology*, v. 27, n. 4, p. 1060–1065, 2010.
- ALIX-PANABIÈRES, C.; RIETHDORF, S.; PANTEL, K. **Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis**. *Clinical Cancer Research*, v. 14, n. 16, p. 5013–5021, 2008.
- ALI, A.; FURUSATO, B.; *et al.* Avaliação de células tumorais circulantes (CTCs) em pacientes com câncer de próstata com tumores de baixo volume. **Pathol Int**. 2010; 60: 667 - 672.
- ALIX-PANABIÈRES C, RIETHDORF S, PANTEL K. Circulating Tumor Cells and Bone Marrow Micrometastasis. **Clin Cancer Res**. 2008;14(16):5013.
- ARGYLE, D. **The molecular biology of cancer**. In Dobson, J.M. Lascelles, B.D.X. (Eds.) *BSAVA manual of canine and feline oncology*. 2003; 2ª Ed:1-9. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- BANYS, M., KRAWCZYK, N., BECKER, S. *et al.* **Breast Cancer Res Treat** (2012) 132: 121.
- BENTUBO, H.D.L.; SOBRAL, R.A.; UBUKATA, R.; HONDA, S.T.; XAVIER, J.G. **Carcinoma inflamatório de mama em cadela: relato de caso**. *Revista Clínica Veterinária*, n. 65, p. 40-44, 2006.
- BERGMAN, P.J. Paraneoplastic Syndromes. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. **Small Animal Clinical Oncology**. 4.ed. Philadelphia, Saunders Elsevier, Cap. 5 p.77-89, 2007

BRAUN, S. *et al.* A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 8, p. 793–802, 2005.

BRAUN, S. *et al.* Cytokeratin-Positive Cells in the Bone Marrow and Survival of Patients with Stage I, II, or III Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 8, p. 525–533, 2000.

Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel JR, Canine mammary gland neoplasms. **Journal. American. Animal Hospital Association**. 1983;19:61-89.

CAMPOS LC., LAVALLE GE., CARNEIRO RA., DUTRA AP., VIANA AAS., CASSALI GD. Carboplatina e inibidor de COX-2 no tratamento do carcinoma inflamatório de mama em cadela: relato de caso. **Rev. Clin. Vet.**, 2011, 92, 72-76.

CANÇADO, R.D. & CHIATTONE, C.S. Anemia da doença crônica. **Ver. Bras. Hemoter.**, 24 (2):127-136,2002

CARIATI, M.; BENNETT-BRITTON, T.M.; PINDER, S.E.; PURUSHOTHAM, A.D. “Inflammatory” breast cancer. **Surgical Oncology**, v. 14, n. 3, p. 133-143, 2005

CASSALI GD, LAVALLE GE, FERREIRA E, *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Braz. J. Vet. Pathol.** 2014;7:38-69.

CASSALI GD. Comparative mammary oncology: canine model. **BMC Proc.**, 2013, 7, Suppl 2, K6.

CASTELLANO MC., IDIART JR. Carcinoma mamário inflamatório em la perra. **Rev. Med. Vet.**, 1994, 76, 244-48.

CAVALCANTI MF., CASSALI GD. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas - revisão. **Rev. Clin. Vet.**, 2006, 11, 56-64.

CHILDRESS, M. O. Hematologic Abnormalities in the Small Animal Cancer Patient. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, v. 42, n. 1, p. 123–155, 2012.

CRIVELLENTI, L.Z. **Alterações glomerulo-tubulares em cadelas com carcinoma mamário**. 2014. 64f. Tese (Doutorado em clínica e cirurgia veterinária) – Universidade Estadual Paulista UNESP campus Jaboticabal.

DA SILVA, A. H. C. *et al.* Alterações no hemograma de cadelas com neoplasia mamária. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 87–92, 2014.

DE NARDI, A. B. **Correlação da ciclooxygenase-2 com Ki-67, P53 e Caspase-3 nas neoplasias de mama em cadelas**. 2007. 110f. Tese Tese (Doutorado em clínica e cirurgia veterinária) – Universidade Estadual Paulista UNESP campus Jaboticabal.

DEARNALEY, D.P.; SLOANE, J.P.; ORMEROD, M.G. Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. **British Journal of Cancer**. V. 44, p85–90, 1981

DUDA, N. C. B. *et al.* Paraneoplastic hematological, biochemical, and hemostatic abnormalities in female dogs with mammary neoplasms. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 479–484, 2017.

ESTRELA-LIMA, A. *et al.* Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 131, n. 3, p. 751–763, 2012.

ELSTON CW, ELLIS IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathol**. 1991;19:403-10.

GARRIDO, E; CASTANHEIRA, TLL; VASCONCELOS, RO. **PubVet** Maringá, v. 9, n. 7, p. 291-297, Jul., 2015

GIORDANO SH, HORTOBAGYI GN, Inflammatory breast cancer: Clinical progress and the main problems that must be addressed. **Breast Cancer Research**. 2003;5(6):284-288.

HU Y, YU X, XU G, *et al.* Metastasis: an early event in cancer progression. **J Cancer Res Clin Oncol**.2017;143:745–757.

ITO, Y.; IWASE, T.; HATAKE, K. Eradication of breast cancer cells in patients with distant metastasis: The finishing touches? **Breast Cancer**, v. 19, n. 3, p. 206–211, 2012.

JAIN,N.C. Comparative hematology of common domestic animals. In: **Essentials of veterinary hemotology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

JAIYESIMI, I. A.; BUZDAR, A. U.; HORTOBAGYI, G. Inflammatory breast cancer: a review. **J Clin Oncol**, v. 10, n. 6, p. 1014–1024, 1992.

KANEKO J.J., HARVEY J.W. & BRUSS M.L. 1997. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5th ed. San Diego:Academic Press, 932p.

KAPLAN, R.N; RIBA, R.D; ZACHAROULIS, S. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche **Nature** v.438, p820–827, 2005.

KARAYANNOPOULOU, M., POLIZOPOULOU, Z.S. KOUTINAS, A.F. *et al.*, Serum alkaline phosphatase isoenzyme activities in canine malignant mammary neoplasms with and without osseous transformation. **Veterinary Clinical Pathology**. Volume 35, Issue 3.September2006.Pages 287–290

KIM, J. H. *et al.* Inflammatory mammary carcinoma with metastasis to the brain and distant organs in a spayed Shih Tzu dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 5, p. 1079–1082, 2011.

KREBS MG, SLOANE R, PRIEST L, *et al.* Avaliação e significado prognóstico de células tumorais circulantes em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas. **J Clin Oncol**. 2011; 29: 1556 - 1563

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

LANGENBACH A., MCMANUS P., HENDRICK M., SHOFER FS., SORENMO KU. Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 2001, 218, 1424-8.

LAVALLE, G. E. *et al.* Cox-2 Expression in Canine Mammary Carcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 6, p. 1275–1280, 2009.

LEAL, D. R. B.S. **Síndromes paraneoplásicas cutâneas no cão e no gato**: 2009.111f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Técnica de Lisboa.

LANA SE, RUTTEMAN GR, WITHROW SJ. Tumors of the Mammary Gland. In: Withrow, SJ; Macewen, EG. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 4.ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2013. p. 619-636.

MANGIERI, J.Síndromes Paraneoplásicas . IN: DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. Primeira edição. São Paulo: ROCA, 2009. Cap. 14. p.238-249.

MANSI, J. L. *et al.* The fate of bone marrow micrometastases in patients with primary breast cancer. **Journal of clinical oncology**: official journal of the American Society of Clinical Oncology, v. 7, n. 4, p. 445–449, 1989.

MARCONATO, L. *et al.* Clinicopathological features and outcome for dogs with mast cell tumors and bone marrow involvement. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 1001–7, 2008.

MARTINEZ, L.M; VALLONE, V.B.F.; LABOVSKY, V. Changes in the peripheral blood and bone marrow from untreated advanced breast cancer patients that are associated with the establishment of bone metastases. **Clin Exp Metastasis** (2014) 31:213–232

MERLO, D. F.; ROSSI, L.; PELLEGRINO, C. *et al.*: Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy, **J Vet Intern Med** 22:976–984, 2008.

MISDORP, W & HERDER, B.A. Bone metastasis in mammary cancer. A report o 10 cases in the female dog and some comparison with human cases. **Br J Cancer**. 1966 Sep; 20(3): 496–503

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T. P. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. 2nd Series. v. VII. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology. **American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology**, 1999. p. 1-59.

MITRA, A.; MISHRA, L.; LI, S. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance **Oncotarget**. 2015 May 10; 6(13): 10697–10711

MOE, L: Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds, *J Reprod Fertil Suppl* 57:439–443, 2001. Neoplasia mamária. **Cienc. anim. bras.**, Goiânia, v.15, n.1, p. 87-92, jan./mar. 2014.

NUNES, F.C., GAMBA, C.O., DAMASCENO, K.A., CAMPOS, C.B., HORTA, R.S., ARAUJO, M.R., MONTEIRO, L.N., LAVALLE, G.E., FERREIRA, E., CASSALI, G.D. Analisis of clinico-pathological data, therapeutical conduct and overall survival of canine mammary lesions attended at veterinary hospital of the Federal Hospital of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). Abstracts – II Encontro de Patologia Mamária Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento das Neoplasias Mamárias da Cadela. **Braz. J. Vet. Pathol**, 7(2): 106 – 143, 2014.

OTONI, C.C.; RAHALL, S.C; VULCANO, L.C. *et al.* Survey radiography and computerized tomography imaging of the thorax in female dogs with mammary tumors. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 52:20, 2010.

OLSSON DC, PIPPI NL, MARTINS DB, *Et al.* Bone marrow harvest in dogs: model for acquisition of the total fraction of mononuclear cells **Rural Science**.2009; 39 (1): 141-147.

OWEN LN. **THE TNM Classification of tumors in domestic animals**. 1 ed. Geneva: World Health Organization.1980;1:52p.

PEDERSEN, L. M.; MILMAN, N. Prevalence and prognostic significance of proteinuria in patients with lung cancer. **Acta Oncologica**, London, v. 35, n. 6, p. 691-695, 1996

PEÑA, L. *et al.* Canine inflammatory mammary carcinoma: Histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 78, n. 2, p. 141–148, 2003.

PICKENS, E. H. *et al.* Unique radiographic appearance of bone marrow metastasis of an insulin-secreting beta-cell carcinoma in a dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 3, p. 350–354, 2005.

PANTEL, K.; SCHHLIMOK, BRAUN S., *ET AL.*. Differential expression of proliferation-Associated molecules in Individual micrometastatic carcinoma cells. **Journal of the National Cancer Institute**, Vol. 85, No. 17, September 1, 1993

PÉREZ-ALENZA, M.D.; JIMÉNEZ, A.; NIETO, A.I.; PEÑA, L. First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. **Breast Cancer research**, v. 6, n. 4, p. 300-307, 2004.

PÉREZ-ALENZA M.D. TABANERA, F, PEÑA L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 2001;219(8):1110–1114.

QUEIROGA, F. L. *et al.* Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: Clinicopathological features and prognostic significance. **Anticancer Research**, v. 25, n. 6 B, p. 4269–4275, 2005.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos – Novas perspectivas. **Congresso de Ciências Veterinárias** [Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, 2002], SPCV, v. 3, p. 183–190, 2002.

RIBAS, C.R.; *et al.* Síndrome paraneoplásica na medicina e na medicina veterinária – revisão. Medvep – **Revista científica de Medicina Veterinária – Pequenos animais e animais de estimação**. 10(35); p. 94-105, 2012.

RIBAS, Cristina Rauen. **Ocorrência de síndromes paraneoplásicas em cães, com base nas alterações clínicas, laboratoriais e patológicas**. 2009. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, São José dos Pinhais.

RODRIGUES MA, GAMBA CO, FARIA JAQA, *et al.* Inner nuclear membrane localization of epidermal growth factor receptor (EGFR) in spontaneous canine model of invasive micropapillary carcinoma of the mammary gland. **Pathology, Research and Practice.** 2016;212(4):340-344.

SCHINDLBECK, C. *et al.* Prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer--results of a standardized follow-up. **Anticancer research**, v. 31, n. 9, p. 2749–55, 2011.

SCHNEIDER R., DORN CR., TAYLOR DON. Factors influencing canine mammary tumor development and postsurgical survival. **J. Natl. Cancer Inst.**, 1969, 43, 1249-1.

SORENMO, K. U. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 33, n. 3, p. 573–96, 2003.

SORENMO, K. U. *et al.* Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 85–97, 2011.

SORENMO, K.U., DEANNA, R.W.; GOLDSMIDT, R.H. **Tumors of the mammary gland.** WITHROW, S.J., VAIL DM. Withrow & MacEwen's Small animal clinical oncology. 5^o Ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 2013, 553-571.

SOUZA CHM., TOLEDO-PIZA E., AMORIN R., BARBOZA A., TOBIAS KM. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. **Can. Vet. J.**, 2009, 50, 506-10.

STOCKHAM SL, KEETON KS, SZLADOVITS B. CLINICAL. Assessment of leukocytosis: distinguishing leukocytoses caused by inflammatory, glucocorticoid, physiologic, and leukemic disorders or conditions. **Vet clin north am small anim pract** ;33:1335-1357.2003.

STOCKHAUS, C. *et al.* Correlation of haemostatic abnormalities with tumour stage and characteristics in dogs with mammary carcinoma. **Journal of Small Animal Practice**, v. 40, n. 7, p. 326–331, 1999.

SUSANECK SJ, ALLEN TA, HOOPES J, WITHROW SJ, MACY DW: Inflammatory mammary carcinoma in the dog. **J Am An Hosp Assoc** 19: 971–976, 1983

SÁ, S.S & REPETTI, C.S.F, Carcinoma inflamatório mamário canino – revisão de literatura. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.1, p.8-14, 2011

TAYLOR, B. E. *et al.* Detection of carcinoma micrometastases in bone marrow of dogs and cats using conventional and cell block cytology. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, n. 1, p. 85–91, 2013.

VAN DER AUWERA I, VAN DEN EYNDEN GG, VAN LAERE SJ, *et al.* Tumor Lymphangiogenesis in Inflammatory Breast Carcinoma: A Histomorphometric Study. **Clin Cancer Res.**2005;11(21):7637-42.

VAN DER PLUIJM, G.; QUE,I.; SIJMONS, B. Interference with the Microenvironmental Support Impairs the De novo Formation of Bone Metastases In vivo. **Cancer research.** ,n. 17v. 65. 2005

VON EULER, H & ERIKSSON, S. Comparative aspects of the proliferation marker thymidine kinase 1 in human and canine tumour diseases. **Veterinary and Comparative Oncology.** v 9, n. 1, 1–15, 2011

WOLFGANG J, FLORIAN VD, WIEDSWANG G, *et al.* Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse – a European Pooled Analysis. **Clin Cancer Res.** 2016; 22(10):2583-2593.

YHEE, J. Y.; YU, C. H.; KIM, J. H.; IM, K. S.; CHON, S. K.; SUR, J. H. albuminuria and cancer incidence. Journal of American Society Nephrology, carcinoma in dogs: 33 cases (1995–1999). **J Am VetMed Assoc** 219(8): 1110–1114, 2001

APÊNDICE A. PRODUÇÃO CIENTÍFICA NÃO RELACIONADA À DISSERTAÇÃO NO PERÍODO DE MARÇO DE 2016 A FEVEREIRO DE 2018

TEIXEIRA, S. V.; NUNES, F.C.; OLIVEIRA, M. R.; CAMPOS, C. B.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. LEVANTAMENTO DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICO-PATOLÓGICOS E SOBREVIDA GLOBAL DE GATAS COM TUMORES MAMÁRIOS ATENDIDAS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFMG. In: III Encontro de Patologia Mamária: DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS E GATAS, 2016, Salvador. III Encontro de Patologia Mamária: DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS E GATAS, 2016.

NUNES, F.C.; CAMPOS, C. B.; TEIXEIRA, S. V.; OLIVEIRA, M. R.; MONTEIRO, L. N.; DAMASCENO, K. A.; NAKAGAKI, K. Y. R.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. LEVANTAMENTO DE DADOS CLÍNICOPATOLÓGICOS DE CADELAS COM TUMOR MISTO BENIGNO, CARCINOMA EM TUMOR MISTO E CARCINOSSARCOMAS DE GLÂNDULAS MAMÁRIAS ATENDIDAS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFMG. In: III Encontro de Patologia Mamária: DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS E GATAS, 2016, Salvador. III Encontro de Patologia Mamária: DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS E GATAS, 2016.

ANEXO A. Certificado do Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 200 / 2016, relativo ao projeto intitulado “Avaliação das alterações hematológicas e medulares em cadelas portadoras de neoplasias mamárias em estadiamento clínico avançado.”, que tem como responsável Geovanni Dantas Cassali, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 23/11/2016. Este certificado espira-se em 23/11/2021.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 200 / 2016, related to the Project entitled “ Evaluation of hematologic and medullary changes in bitches with mammary tumors in advanced clinical stage.”, under the supervision of Geovanni Dantas Cassali, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 23/11/2016. This certificate expires in 23/11/2021.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 23/11/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

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

ANEXO B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aos proprietários.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: "Pesquisa de células tumorais disseminadas em medula óssea e alterações hematológicas e bioquímicas em cadelas portadoras de neoplasias mamárias em estadiamento clínico avançado e carcinoma inflamatório de mama"

Nome da Pesquisadora: Miriã Rodrigues de Oliveira

Nome do Orientador: Geovanni Dantas Cassali

Prezado(a) Senhor(a),

Você está sendo convidada(o) a autorizar a participação de seu(s) animal(is) nesta pesquisa que tem como finalidade observar alterações hematológicas e em medula óssea em cadelas portadoras de neoplasias mamárias em estadiamento clínico avançado.

Identificação do(s) animal (is):

Envolvimento na pesquisa: *ao participar deste estudo o Sr.(Sra.) permitirá que seu animal seja submetido à coleta de sangue para análise de alterações hematológicas e coleta de medula óssea para pesquisa de micrometástases. O Sr.(Sra.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o seu animal. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone da pesquisadora do projeto.*

Riscos e desconforto: *a participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Princípios Éticos na Experimentação Animal.*

- 1. Confidencialidade:** *todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados.*
- 2. Benefícios:** *esperamos que este estudo forneça informações importantes sobre a evolução das neoplasias mamárias em cadelas para que se estabeleçam possíveis tratamentos voltados para o câncer de mama na espécie canina, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa auxiliar na rotina da oncologia veterinária aumentando a sobrevivência dos animais com manutenção de sua qualidade de vida.*

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

Nome do Proprietário (CPF/RG)

Assinatura do Proprietário

Assinatura do Pesquisador

Data: _____

TELEFONES

Pesquisadora: (31) 99220-2044

Orientador: (31) 3409-2883