

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

AMANDA DE DEUS FERREIRA ALVES

Caracterização clínico-patológica das neoplasias mamárias em gatas

Recife/PE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

AMANDA DE DEUS FERREIRA ALVES

Caracterização clínico-patológica das neoplasias mamárias em gatas

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior.

Co-orientadoras: Profa. Dra. Márcia Bernase de Araújo Medeiros;
Profa. Dra. Márcia de Figueiredo Pereira.

Recife/PE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

A474c Alves, Amanda de Deus Ferreira
Caracterização clínico-patológica das neoplasias mamárias em
gatas / Amanda de Deus Ferreira Alves. – 2019.
69f. : il.

Orientadora: Valdemiro Amaro da Silva Junior.

Coorientador: Márcia Bernase de Araújo Medeiros ; Márcia de
Figueiredo Pereira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Programa de Pós-
Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências e apêndice(s).

1. Felídios - Doenças 2. Mamas - Câncer 3. Tumor 4. Mamas -
Doenças - Diagnóstico I. Silva Junior, Valdemiro Amaro da, orient.
II. Medeiros, Márcia Bernase de Araújo, coorient. III. Pereira, Márcia de
Figueiredo, coorient. IV. Título

CDD 636.089

AMANDA DE DEUS FERREIRA ALVES

Caracterização clínico-patológica das neoplasias mamárias em gatas

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Profa. Dra. Ana Paula Veras Sobral

Faculdade de Odontologia de Pernambuco da Universidade de Pernambuco

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Recife/PE

2019

RESUMO

As neoplasias mamárias são alterações proliferativas que mais acometem mulheres, cadelas e gatas e são responsáveis pela morte de centenas de indivíduos em todo o mundo. Dentre as formas de diagnóstico, o exame histopatológico é considerado o padrão-ouro, sendo possível apreciar além da arquitetura histológica, o grau de invasividade da neoplasia, o índice mitótico e outros fatores como a presença de necrose. Podem ainda complementar o diagnóstico a pesquisa de marcadores biológicos no tecido neoplásico e no sangue das pacientes. Desse modo, este trabalho teve por objetivo fazer a caracterização clínico-patológica e a pesquisa de Ciclo-oxigenase 2 (COX-2), do Antígeno Carcinoembrionário (CEA) e do Antígeno do Câncer 15.3 (CA15.3) em gatas com neoplasias mamárias. Para cada animal foram coletadas informações por meio de questionário investigativo e amostras de sangue para dosagem sérica de CEA e CA15.3. As amostras provenientes de mastectomia foram fixadas em formol 10% tamponado e processadas a partir da técnica histopatológica com impregnação em parafina e coloração em Hematoxila e Eosina. Sendo então realizada a classificação e graduação histopatológica das lesões. Para realização da técnica de imunohistoquímica a recuperação antigênica foi conseguida em panela de pressão, com posterior incubação com anticorpo primário monoclonal anti-Cox 2 (clone SP21, ThermoFisher), na diluição de 1:80 e amplificação a partir do polímero marcado com a enzima Horseradish Peroxidase (EnVision™+ Dual Link System-HRP). Para quantificação do CA 15.3 e CEA a partir do soro das gatas foram utilizados os testes ELISA IBL humano e ELISA CanAg CEA EIA humano, respectivamente, que consistem em ensaios não competitivos de fase sólida baseados na técnica direta de sanduíche. Desse modo, foram analisados 81 tumores mamários provenientes de 52 gatas. Metade dos animais tinham entre oito a 12 anos e 94,23% não tinham raça definida. Em 55,77% dos casos os tutores afirmaram já ter feito pelo menos um aplicação de anticoncepcional, destas 79,31% desenvolveram neoplasias malignas. No momento do procedimento cirúrgico, 60% das gatas já estavam em estadiamento clínico grau III, em alguns casos com metástase em linfonodo regional. As neoplasias malignas corresponderam a 82,71%, sendo os tipos cribriforme, tubulopapilar e tubular os mais frequentes, estando a maioria deles no grau histopatológico II (83,58%). De modo geral, os

carcinomas mamários são os mais frequentes nas gatas, sendo verificada baixa imunomarcção para Cox-2 e para a concentração de CEA e CA15.3. Porém, a detecção da Cox-2 nos fragmentos de tumores mamários em gatas, não teve relação direta com o prognóstico. Os testes para os marcadores CA 15.3 e CEA, quando realizados a partir de kits para humanos, não devem ser utilizados como indicadores para detecção de neoplasias mamários em gatas, devido à baixa sensibilidade e ou especificidade do teste.

Palavras-chave: Tumor; carcinoma; mama; felinos.

ABSTRACT

Breast neoplasms are proliferative changes that affect women, bitches and cats the most, and are responsible for the deaths of hundreds of individuals around the world. Among the forms of diagnosis, the histopathological examination is considered the gold standard, and it is possible to appreciate besides the histological architecture, the degree of invasiveness of the neoplasia, the mitotic index and other factors such as the presence of necrosis. Biological markers in the neoplastic tissue and in the patients' blood may also complement the diagnosis. The aim of this study was to characterize the clinical and pathological characterization and investigation of cyclooxygenase-2 (COX-2), Carcinoembryonic Antigen (CEA) and Cancer Antigen 15.3 (CA15.3) in cats with breast neoplasias . For each animal, information was collected by means of an investigative questionnaire and blood samples for serum levels of CEA and CA15.3. Samples from mastectomy were fixed in 10% buffered formalin and processed from the histopathological technique with paraffin impregnation and staining in Hematoxyl and Eosin. The classification and histopathological classification of the lesions were then performed. For the immunohistochemical technique the antigenic recovery was achieved in a pressure cooker, with subsequent incubation with anti-Cox 2 monoclonal primary antibody (clone SP21, ThermoFisher), at the dilution of 1:80 and amplification from the polymer labeled with the enzyme Horseradish Peroxidase (EnVision TM + Dual Link System-HRP). Quantification of CA 15.3 and CEA from human calves was performed using ELISA human IBL ELISA and CanAg CEA human EIA ELISA, respectively, consisting of non-competitive solid phase assays based on the direct sandwich technique. Thus, 81 breast tumors from 52 cats were analyzed. Half of the animals were between eight and 12 years old and 94.23% had no defined breed. In 55.77% of the cases, the tutors stated that they had already done at least one contraceptive application, of which 79.31% developed malignant neoplasms. At the time of the surgical procedure, 60% of the cats were already in stage III clinical staging, in some cases with regional lymph node metastasis. Malignant neoplasms corresponded to 82.71%, with cribriform, tubulopapillary and tubular types being the most frequent, most of them in histopathological grade II (83.58%). In general, mammary carcinomas are the most frequent in the cats, with low immunolabeling for Cox-2 and

for the concentration of CEA and CA15.3. However, the detection of Cox-2 in fragments of mammary tumors in cats was not directly related to the prognosis. The tests for CA 15.3 and CEA markers, when performed from human kits, should not be used as indicators for detection of breast neoplasms in cats due to the low sensitivity and / or specificity of the test. Keywords:

Tumor; carcinoma; breast; cats.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Glândula mamária.....	14
2.2 Neoplasias mamários.....	14
2.2.1 Classificação histopatológica.....	16
2.2.1.1 Lesões hiperplásicas.....	17
2.2.1.2 Neoplasias benignas.....	18
2.2.1.3 Neoplasias malignas.....	20
2.2.2 Graduação histopatológica.....	24
2.2.3 Metástases.....	24
2.2.4 Estadiamento clínico.....	26
2.3 Biomarcadores para neoplasias mamárias.....	27
2.3.2 Antígeno carcinoembrionário (CEA).....	28
2.3.1 Antígeno do câncer 15.3 (CA15.3).....	29
2.3 Ciclo-oxigenase (Cox-2).....	29
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Geral.....	31
3.2 Específicos.....	31

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Amostras.....	31
4.2 Processamento histopatológico.....	32
4.3 Classificação e graduação histopatológica.....	33
4.4 Teste imunohistoquímico para COX-2.....	33
4.5 Amostras de sangue para testes séricos.....	35
4.6 Teste ELISA para quantificação de CA15.3 em amostras de soro.....	35
4.7 Teste ELISA para quantificação de CEA em amostras de soro.....	36
4.8 Análise estatística.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
ARTIGO: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO PATOLÓGICA E PESQUISA DE	44
COX-2, CEA E CA15.3 EM GATAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS	
APÊNDICE.....	63

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Fotomicrografia de tumores mamários em gatas. (A) Carcinoma cribriforme. Proliferação epitelial originando pseudolumens (seta) com extensa área de necrose (estrela). HE, 100x. (B) Carcinoma tubulopapilar. Células epiteliais originando estruturas tubulares com projeções papilares (seta). HE, 400x. (C) Carcinoma sólido. Células epiteliais distribuídas na forma de manto. HE, 400x. (D) Carcinoma micropapilar. Projeções de micropapilas a partir de delicado feixe fibroso (seta). HE, 400x. (E) Carcinoma de células escamosas. Observar a formação de pérolas córneas (seta). HE, 100x. (F) Hiperplasia fibroepitelial. Estroma fibroso com proliferação epitelial originando estruturas tubulares (cabeça de seta). HE, 100x. 52
Figura 2	Fotomicrografia da imunomarcação para Cox-2 em neoplasias mamárias. (A) Marcação moderada em carcinoma papilar. (B) Marcação positiva em endotélio vascular. (C) Marcação positiva em células inflamatórias. (D) Marcação positiva em fibroblastos do espaço intersticial. 400x. 54
Figura 3	Média e desvio padrão da concentração de CA 15.3 U/ml em grupo tumores (GT) e grupo controle (GC). 55
Figura 4	Concentração de CEA µg/L, incluindo calibradores do teste, animais com tumores e animais controle. 55

LISTA DE QUADROS

	Página
Tabela 1 Classificação histopatológico de tumores mamários em gatas (CASSALI et al. 2018).	17
Tabela 2 Graduação histológica de carcinomas mamários (ELSTON & ELLIS, 1998).	24
Tabela 3 Estadiamento clínico da Organização Mundial da Saúde, modificado para tumores mamários felinos, de acordo com o sistema TNM (BORREGO et al., 2009; MCNEILL et al., 2009).	26
Tabela 4 Estadiamento clínico da Organização Mundial da Saúde, modificado para tumores mamários felinos, de acordo com o sistema TNM (BORREGO et al., 2009; MCNEILL et al., 2009).	32
Tabela 5 Graduação histológica de carcinomas mamários (ELSTON & ELLIS, 1998).	33

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Frequência absoluta e relativa das variáveis idade e raça de gatas com tumores mamários.	49
Tabela 2 Frequência absoluta e relativa sobre a realização de castração e uso de anticoncepcionais em gatas com tumores mamários	50
Tabela 3 Frequência absoluta e relativa do tamanho tumoral e estadiamento clínico (TNM) das gatas com tumores mamários.	50
Tabela 4 Diagnóstico histopatológico de tumores mamários em gatas.	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Por cento
*	Asterisco
B	Beta
AINE's	Anti-inflamatório Não Esteroidal
CA 15.3	Antígeno do Câncer 15.3
CEA	Antígeno Carcinoembrionário
Cox-2	Ciclo-oxigenase 2
HE	Hematoxilina e Eosina
kDa	Quilodalton
M	Metástase à distância
mL	Mililitro
N	Metástase regional
OMS	Organização Mundial de Saúde
OSH	Ovariossalpingohisterectomia
T	Tamanho
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco

1. INTRODUÇÃO

Neoplasias mamárias são alterações causadas pela multiplicação desordenada de células da mama. Este é o tipo de doença mais comum entre as mulheres (OLIVEIRA & SILVA, 2011) e no Brasil corresponde a cerca de 25% dos casos novos a cada ano (INCA, 2018). Em cadelas e gatas a ocorrência das neoplasias mamárias é bem semelhante, sendo o principal tipo entre as fêmeas (OLIVEIRA FILHO et al, 2010; TOGNI et al, 2013). Se caracterizam pela formação de lesões nodulares, únicas ou múltiplas, na cadeia mamária que podem ter crescimento rápido e aparecimento de áreas ulceradas (FILGUEIRA et al, 2008).

As neoplasias mamárias em gatas ocorrem mais facilmente em animais a partir de oito anos de idade (TOGNI et al, 2013). É uma alteração hormônio dependente, que acomete animais não castrados e aqueles castrados tardiamente. Sabe-se que a castração antes do primeiro cio reduz o risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias em até 90%, sendo uma importante medida protetiva (QUEIROGA; LOPES, 2002).

Esse processo neoplásico é complexo e envolve várias etapas controladas por alterações genéticas como a ativação de oncogenes ou silenciamento de genes supressores tumorais. Além disso, tem importância crescente na atualidade, as influências do microambiente tumoral que relacionam os fatores pró e anti-inflamatórios (PIERCE et al, 2009). Outro fator importante no processo de carcinogênese é a alteração no estilo de vida da sociedade moderna, que conseqüentemente promove mudanças também nos hábitos alimentares dos animais e em seu ambiente (TOBÍRIO et al, 2012).

O diagnóstico precoce ainda é importante para que se tenha mais sucesso, sendo a exérese cirúrgica a principal forma de tratamento. Porém, outras ferramentas podem e devem ser usadas quando houver necessidade de complementar o tratamento (OLIVEIRA & SILVA, 2011). O uso da quimioterapia tem apresentado uma ação citotóxica direta, inibindo a

angiogênese tumoral, um processo crítico para o desenvolvimento, progressão e metástases das neoplasias. A quimioterapia não substitui o tratamento convencional, mas pode ser utilizada como alternativa ao tratamento paliativo de pacientes com neoplasias metastáticas ou em casos de tumor inoperável (CAMPOS; LAVALLE & NUNES, 2017).

O diagnóstico histopatológico é considerado padrão ouro, permitindo além da classificação morfológica do tumor, avaliar o grau de infiltração, o pleomorfismo celular e o índice mitótico (FERREIRA et al, 2017). Sendo ainda possível avaliar outras características através da imunomarcção, como a expressão de receptores para Ciclo-oxigenase 2 (Cox-2), que tem sido relacionada a neoplasias de comportamento biológico agressivo, pior prognóstico e menor tempo de sobrevida (CAMPOS; LAVALLE & NUNES, 2017).

Mais recentemente, com os avanços da biologia molecular, surgem novas perspectivas visando a prevenção, diagnóstico precoce e tratamentos mais eficazes para as neoplasias mamárias. Nesse contexto, os marcadores tumorais, que são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente pelas células ou pelo tecido normal em resposta a presença do tumor, vêm sendo utilizados para monitoramento de recidivas e metástases em pacientes com neoplasias mamárias (MATA, 2017). Na medicina veterinária o uso dos biomarcadores tumorais são mais frequentes em cadelas, contudo sua utilização em gatas com neoplasias mamárias começa a ser um campo de investigação importante. (CAMPOS et al, 2012).

Desse modo, objetivou-se caracterizar histopatologicamente as neoplasias mamárias, bem como determinar a imunomarcção para Cox-2 e os níveis séricos dos marcadores biológicos Antígeno Carcinoembrionário (CEA) e Antígeno do Câncer 15.3 (CA15.3) em gatas residentes na região metropolitana do Recife-PE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Glândula mamária

As glândulas mamárias são caracterizadas como glândulas sudoríparas apócrinas da pele, modificadas e especializadas, características de mamíferos e responsáveis pela nutrição do filhote. A presença de células mioepiteliais situadas entre as bases das células acinares e a lâmina basal que contorna os ácinos ou alvéolos (ou tubuloácinos) comprova sua origem como glândula apócrina (NOGUEIRA & CASTRO, 2017).

A cadeia mamária é formada por duas linhas paralelas, partindo da região axilar até a região inguinal. As gatas, comumente possuem quatro pares de mamas, que são denominadas torácicas, abdominais craniais e caudais, e o último par, mamas inguinais. Ocasionalmente, alguns animais podem ter um par de mamas rudimentares, totalizando assim cinco pares (RAHARISON e SAUTET, 2005).

A drenagem linfática da cadeia mamária ocorre normalmente para os linfonodos regionais e não há drenagem para a glândula contralateral. As mamas torácicas e abdominais craniais drenam para o linfonodo axilar, e as mamas abdominal caudal e inguinal para os linfonodos inguinais superficiais. Na presença de neoplasia, o fluxo linfático pode estar alterado e pode ocorrer metástases por via retrógrada por meio do plexo linfático ou linfonodos poplíteos (SORENMO et al, 2011).

Nas fêmeas, a glândula mamária está sujeita a variações no decorrer da puberdade, gestação, fases de lactação e de involução glandular, influenciadas por hormônios placentários, hipofisários e ovarianos, muito importantes para o surgimento das neoplasias mamárias (NOGUEIRA & CASTRO, 2017).

2.2 Neoplasias mamárias

As neoplasias mamárias são descritas como o terceiro tipo mais comum de tumor felino, atrás apenas dos tipos hematopoiéticos e os cutâneos (MISDORP, 2002; LANA et al., 2007). Contudo, em pesquisa realizada no Brasil, as neoplasias mamárias representaram o segundo tipo mais comum de tumor na espécie (TOGNI et al., 2013).

O risco de desenvolvimento da neoplasia de mama é essencialmente determinado pela intensidade e duração da exposição do epitélio mamário à ação conjunta da prolactina e do estrógeno (KOJIMA et al., 1996). Segundo a literatura, a prolactina é necessária para a manutenção da atividade secretória, não desempenhando papel sobre a proliferação celular da glândula mamária. As alterações proliferativas que ocorrem no tecido mamário durante a gestação estão associados aos hormônios de crescimento e à progesterona. A prolactina estimula o crescimento do tumor mamário através da sensibilização celular aos efeitos do estrógeno, promovendo aumento no número de receptores de estrógeno (MORRISSON, 1998). Este, promove o crescimento celular por estimular a liberação do fator de crescimento tumoral alfa e do fator de crescimento semelhante à insulina e por inibir o fator de crescimento tumoral β (TNF- β) (NOGUEIRA & CASTRO, 2017) que induzem a proliferação ductal (MORRISON, 1998).

Devido à alta relação dos tumores mamários com alterações hormonais, a realização da Ovarioossalpingohisterectomia (OSH) numa idade muito jovem reduz significativamente a incidência de neoplasia mamária em gatas mais velhas. Segundo a literatura, a incidência é aproximadamente sete vezes maior em gatas inteiras quando comparados a gatas ovarioisterectomizadas, e o risco de desenvolver uma neoplasia mamária aumenta com cada ciclo estral (TOGNI et al, 2013).

As gatas esterilizados antes dos seis meses de idade têm uma redução de 91% no risco de desenvolvimento de carcinomas mamários em comparação com gatas inteiras. Nos esterilizados antes de um ano, há uma redução de

86% no risco. Não há benefício significativo após os dois anos de idade. O número de partos não é considerado profilático ao desenvolvimento de carcinoma mamário (FIGUEIREDO, 2011).

O uso de hormônios exógenos, principalmente a base de progesterona e estrógeno, podem elevar o risco em até quatro vezes de fêmeas desenvolverem tumores mamários (OLIVEIRA et al, 2003). Em cães e gatos, a administração de progesterona exógena estimula a síntese de hormônio do crescimento da glândula mamária com proliferação lóbulo-alveolar e consequente hiperplasia de elementos mioepiteliais e secretórios, induzindo comumente a formação de nódulos benignos em animais jovens (MEUTEN, 2002).

Todavia, o risco de desenvolvimento de neoplasias malignas tem sido observado na administração contínua e em altas doses de estrógeno associado a progesterona (MORRISON, 1998), pois na carcinogênese hormonal, a proliferação celular antecede ou sucede as mutações genéticas (SILVA et al, 2004).

2.2.1 Classificação histopatológica

O diagnóstico histopatológico é o método de eleição para identificar as características de uma neoplasia, sendo fundamental para a correta apreciação de lesões suspeitas de neoplasia mamária, podendo ser efetuado a partir de cortes do tumor retirado cirurgicamente ou de fragmento de biópsia incisional. O exame histopatológico possibilita classificar o tumor, chamando atenção ao fato de ser necessário examinar fragmentos provenientes de vários pontos da neoplasia, bem como da margem cirúrgica. Deste modo, é possível avaliar o grau de invasão local, reação inflamatória e displasia, que frequentemente ocorrem quando há tumores mamários (PELETEIRO, 1994).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), classifica as lesões de mama em tumores malignos, benignos e hiperplasias/displasias mamárias (MISDORP et al, 1999). Sendo considerada uma importante literatura quando se trata da classificação dos tumores mamários na espécie felina.

Mas recentemente, Cassali et al (2018) com base em inúmeros trabalhos de pesquisa sobre a classificação histopatológica de tumores mamários em gatas, propôs um consenso para o diagnóstico, prognóstico e tratamento de tumores mamários em felinos. Na **Quadro 1** são listadas as classificações para lesões neoplásicas e não neoplásicas em cadeia mamária de gatas.

Quadro 1: Classificação histopatológica de tumores mamários em gatas (Cassali et al 2018).

NEOPLASIAS BENIGNAS	NEOPLASIAS MALIGNAS	HIPERPLASIAS
Adenoma	Carcinoma não infiltrativo (<i>in situ</i>)	Hiperplasia ductal
Fibroadenoma	Carcinoma tubulopapilar	Hiperplasia lobular
Tumor misto benigno	Carcinoma sólido	Hiperplasia fibroepitelial
Papiloma ductal	Carcinoma cribriforme	Adenose
	Carcinoma de células escamosas	Ectasia ductal
	Carcinoma mucinoso	
	Carcinossarcoma	
	Carcinoma micropapilar	
	Carcinoma rico em lipídeo	
	Carcinoma tubular	
	Carcinoma papilar	
	Carcinoma rico em glicogênio	
	Carcinoma em tumor misto	
	Adenomioepitelioma maligno	

2.2.1.1 Lesões hiperplásicas

Hiperplasias

As hiperplasias são caracterizadas por proliferação de ductos revestidos por uma ou mais células epiteliais, exibindo baixo pleomorfismo, e um estroma conjuntivo frouxo. Figuras mitóticas são raras, mas podem ser visualizados tanto no estroma quanto o epitélio (CASSALI et al 2018).

Na hiperplasia ductal, as células proliferam dentro do ducto e estão dispostas em uma ou mais camadas, às vezes formando pontes intraductais irregulares. As lesões atípicas produzem células monomórficas regularmente distribuídas com núcleos ovóides e podem criar padrões arquitetônicos mais elaborados com pontes epiteliais mais robustas. (CASSALI et al 2018).

A hiperplasia lobular, ocorre nas porções terminais das unidades lobulares das glândulas mamárias, que são ocupadas por um

supercrescimento uniforme de células com baixo pleomorfismo e núcleos uniformes. Enquanto que na hiperplasia fibroepitelial há proliferação de ductos revestidos por uma ou mais células epiteliais, exibindo baixo pleomorfismo, e por tecido conjuntivo edematoso e frouxo (CASSALI et al 2018).

Adenose

É caracterizada pelo aumento do número de ácinos com ou sem dilatação dos ductos intralobulares, que mantêm a arquitetura, mas com um aumento no diâmetro das unidades lobulares (CASSALI et al 2018). Em cadelas, pode estar associada a raras e discretas alterações nos tecidos epitelial, mioepitelial e fibroso periductal (adenose esclerosante). É pouco frequente em caninos e aparentemente não está relacionada ao processo de progressão neoplásica (FERREIRA & CASSALI et al 2017).

Ectasia ductal

Consiste na dilatação cística dos ductos galactóforos. Microscopicamente, apresenta variáveis dilatações ductais, circundada por um estroma fibroso denso, frequentemente associada a inflamação mononuclear. Pode apresentar secreção proteinácea e homogênea, com a presença de células espumosas (CASSALI et al 2018). A ectasia do ducto pode ser difícil de diferenciar dos cistos; no entanto, os primeiros são geralmente menores e de origem ductal reconhecível (MISDORP et al, 1999).

2.2.1.2 Neoplasias benignas

Adenoma

Tumor benigno composto por estruturas acinares apresentando uma camada de células epiteliais e mioepiteliais, cercadas por membrana basal. As células são bem diferenciadas e exibem crescimento expansivo, com fronteiras bem definidas. O adenoma deve ser diferenciado da adenose porque exhibe

perda da arquitetura com ausência de ductos intralobulares. Alguns adenomas possuem secreção intratubular. (CASSALI et al 2018).

Fibroadenoma

É uma neoplasia benigna que consiste em uma mistura de células epiteliais luminais e células estromais, às vezes com presença de células mioepiteliais (CASSALI et al 2018). Pode ser classificado em fibroadenoma de baixa ou alta celularidade, pode afetar uma ou várias glândulas mamárias e tem crescimento rápido. O estroma do fibroadenoma de alta celularidade pode ser extremamente celular e rico em figuras mitóticas. É uma neoformação bastante comum na gata (MISDORP et al, 1999).

São observados túbulos revestidos por células epiteliais cúbicas a colunares, com núcleo redondo e uniformes. As células estromais fibroblásticas possuem núcleos alongados com citoplasma escasso e margens indistintas (DAMASCENO et al, 2017).

Tumor misto benigno

Caracteriza-se pela proliferação de células epiteliais benignas num arranjo tubular e/ou papilar de camada única associado à proliferação de células mioepiteliais com matriz mixoide e/ou condróide benigna e/ou formação de matriz óssea, juntamente com cartilagem madura e/ou tecido ósseo. A arquitetura pode às vezes ser bastante heterogênea, e o pleomorfismo celular pode ser moderado, levando eventualmente a um diagnóstico maligno por patologistas menos experientes (CASSALI et al 2018).

Papiloma ductal

É considerada uma lesão ocasional. Possui aspecto ramificado ou lobulado em um ducto distinto e, microscopicamente, caracteriza-se por proliferação do epitélio ductal em arranjo papilar ou arborescente sustentada por um eixo fibrovascular bem definido. As papilas podem se desenvolver em

um único foco ou em múltiplos focos em vários ductos. Os ductos adjacentes são muitas vezes ectásicos e revestidos por células epiteliais (DAMASCENO et al 2017).

2.2.1.3 Neoplasias malignas

Carcinoma não infiltrativo (in situ)

Caracterizado por epitélio neoplásico com células que proliferam tanto no lúmen do ducto extralobular quanto nas unidades ductolobulares terminais da glândula mamária, sem invasão ou descontinuidade da membrana. As células neoplásicas podem ser organizadas nos padrões: papilares, micropapilares, cribriforme, sólido ou sólido com comedonecrose (necrose central) (GAMBA et al 2017). Este tipo é considerado um potencial precursor para o carcinoma invasivo, já descrito em mulheres (HASSAN et al 2016) e cadelas (GAMBA et al 2017).

Carcinoma tubulopapilar

É caracterizado por ter a formação de túbulos e/ou projeções papilares (MISDORP et al, 1999). Este é a união de duas classificações, tubular e papilar (CASSALI et al, 2018), podem ser neoplasias invasivas de origem ductal que morfológicamente revelam formação de túbulos arredondados, ovoides ou angulares que exibem proliferação epitelial arborescente com formação inúmeras projeções intraluminais. Podem apresentar extensas áreas de fibroplasia e áreas de necrose de coagulação. O pleomorfismo celular e anisocariose são variáveis, podendo ser observado também infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intratumoral (GAMBA et al, 2017).

Carcinoma sólido

No carcinoma sólido as células se dispõem na forma de manto, cordões ou ninhos e em alguns casos são compostos por células com citoplasma vacuolizado (CASSALI et al, 2018). Sendo relativamente comum em gatas

(MISDORP et al, 1999). A neoplasia comumente apresenta índice mitótico elevado, a quantidade de estroma pode variar de pequena a moderada (GAMBA et al, 2017).

Carcinoma cribriforme

O carcinoma cribriforme é uma neoplasia epitelial maligna (GAMBA et al, 2017), que se caracteriza microscopicamente como um carcinoma sólido com aberturas pequenas que formam pseudolumens, de diâmetros variados, por vezes se assemelhando a uma peneira. Outra característica marcante deste tipo de carcinoma é a presença de material necrótico no centro da lesão (CASSALI et al, 2018).

Carcinoma de células escamosas

Este tipo de carcinoma é organizado de forma sólida e em cordões de células com áreas de diferenciação escamosa. Na periferia é mais comum a observação de células basalóides e na parte central células tumorais necróticas associadas a queratina. É um tipo altamente infiltrativo e a invasão linfática é comum. A parte central, nos tumores mais diferenciados, consiste em lâminas de queratina, formando pérolas córneas. A condição determinante para o diagnóstico definitivo dessa neoplasia é a ausência de ligação com a epiderme cutânea que permite diferenciá-lo dos carcinomas de células escamosas cutâneas (GAMBA et al, 2017).

Carcinoma mucinoso

São neoplasias raramente observadas na glândula mamária que se caracterizam pela grande quantidade de mucina. Microscopicamente, são visualizadas múltiplos grupamentos epiteliais organizados em padrão sólido, podendo ou não formar estruturas ductais, embebidos em extenso material amorfo basofílico (mucina). As células tumorais são poliédricas com citoplasma vacuolizado (GAMBA et al 2017).

Ele pode ser puro, isto é, 100% mucinoso ou, mais comumente, misto, quando outros padrões carcinomatosos estão presentes. A mucina pode formar lagos extracelulares pequenos onde é anfofílico a ligeiramente basofílico, ou pode ser encontrado no citoplasma da célula (CASSALI et al 2018).

Carcinossarcoma

Composto por uma população de células heterogêneas de origem epitelial e mesenquimal de características malignas. As células epiteliais são dispostas em ninhos sólidos, túbulos e/ou papilas e exibem proeminentes núcleos ovóides e nucléolos. A proliferação mesenquimal é altamente celular, apresentando células pleomórficas em forma fusiforme e alongadas, núcleos ovais, com índices mitóticos moderados a acentuados. Áreas com padrão mixóide, condróide e/ou formação de matriz osteóide, podem coexistir juntamente com tecido adiposo maduro (CASSALI et al 2013).

Carcinoma micropapilar

Em mulheres, diz respeito a uma variante rara do carcinoma invasivo em que se formam maciços epitélios de aspecto micropapilar sem ser evidente um eixo fibrovascular, há também marcada retração em relação ao estroma que o circunda (OLIVEIRA & SILVA, 2002). Microscopicamente, revela formações císticas difusamente distribuídas no estroma tumoral contendo em seu interior grupamentos de células epiteliais que exibem um padrão circular com superfície externa irregular (CASSALI et al, 2018).

Carcinoma rico em lipídeos

Caracteriza-se por células neoplásicas contendo vacúolos únicos ou múltiplos, deslocando o núcleo para a periferia (ESPINOSA DE LOS MONTEROS et al, 2013), resultando em um aspecto de “anel de sinete”, observada em pelo menos 80% das células neoplásicas. A neoplasia demonstra crescimento expansivo, sendo composto por grupamentos de células epiteliais

em arranjo sólido e/ou cordonal, envolvidos por quantidade moderada de estroma (GAMBA et al 2017).

Carcinoma tubular

Esta neoplasia tem características invasivas e se origina a partir de ductos. Microscopicamente, apresenta grupamentos de células epiteliais em arranjo tubular, arredondados, ovóides ou angulares, em pelo menos 90% do tumor (CASSALI et al, 2018), que se caracterizam por crescimento infiltrativo com áreas de invasão estromal e linfática. Pode conter ainda, extensas áreas de fibroplasia, necrose de coagulação e metaplasia escamosa (GAMBA et al, 2017).

Carcinoma papilar

São neoplasias caracterizadas por proliferação epitelial arborescente com formação de inúmeras projeções intraluminais com estroma fibrovascular central (CASSALI et al, 2018). É importante ressaltar que as projeções são delimitadas por várias camadas de células epiteliais com ausência de células mioepiteliais (GAMBA et al, 2017).

Muito comumente carcinomas papilares podem apresentar também estruturas tubulares, assim como carcinomas tubulares possuem, em maior ou menor grau, projeções papilares, de modo que muitas vezes os autores classificam estes dois tipos de forma mais genérica como sendo o carcinoma tubulopapilar, sendo então a frequência do tubular ou papilar isoladamente pouco citada na literatura.

Carcinoma rico em glicogênio

A avaliação microscópica demonstra células epiteliais dispostas em um padrão predominantemente sólido, as células tumorais apresentando um citoplasma amplo, granular e espumoso, por vezes com aspecto de “anel de sinete”, e pleomorfismo celular moderado. A presença de glicogênio citoplasmático deve ser confirmada através da digestão da diastase seguida

pela coloração com ácido periódico-Schiff (PAS). Neoplasia rara em cadelas e já descrita na gata (CASSALI et al 2018; GAMBA et al 2017).

Carcinoma em tumor misto

Microscopicamente, são constituídos por uma variável proporção de um componente epitelial e um componente mesenquimal benigno que pode ser representado por cartilagem e/ou osso e/ou tecido adiposo (GAMBA et al 2017).

O aspecto multilobular é frequentemente observado. O componente epitelial maligno caracteriza-se por focos ou nódulos de células epiteliais cúbicas a colunares com elevado pleomorfismo e mitoses atípicas. Eventualmente podem ser observadas áreas de metaplasia escamosa. Ainda podem ser citadas a alta celularidade, elevado pleomorfismo, alto índice mitótico, focos de necrose e o padrão de crescimento infiltrativo (GAMBA et al 2017).

Adenomioepitelioma maligno

Tumor caracterizado pela proliferação de células mioepiteliais que exibem pleomorfismo moderado, associado a áreas *in situ* e invasivas de células epiteliais malignas. A transformação maligna pode ocorrer tanto no componente epitelial ou mioepitelial ou em ambos. As células epiteliais exibem pleomorfismo moderado e nucléolos múltiplos e proeminentes. Em geral, as células deste tipo de tumor têm um baixo índice mitótico (CASSALI et al 2018).

Trata-se de um tipo histológico considerado no diagnóstico diferencial de carcinossarcomas, contudo, não há evidências de componente sarcomatoso (GAMBA et al 2017).

2.2.2 Graduação histopatológica

No carcinoma de mama, é necessário conhecer não somente a variante histológica do carcinoma, mas também os indicadores prognósticos como o

grau histológico e o estadiamento clínico do paciente (FERREIRA et al, 2017). O grau histológico é um parâmetro analisado a partir da avaliação do grau de formação tubular, pleomorfismo nuclear e número de mitoses, conforme **Quadro 2**. O sistema mais utilizado é o de Nottingham, modificado por Elston e Ellis (1998).

Quadro 2: Graduação histológica de carcinomas mamários (Elston e Ellis, 1998).

PONTOS	FORMAÇÃO TUBULAR	PLEOMORFISMO NUCLEAR	ÍNDICE MITÓTICO
1	>75%	Discreto	0 – 7
2	10 – 75%	Moderado	8 – 16
3	<10%	Acentuado	>17
PONTUAÇÃO TOTAL		GRAU HISTOLÓGICO	
3 – 5		I – Baixo grau, tumor bem diferenciado	
6 – 7		II – Grau intermediário, moderadamente diferenciado	
8 – 9		III – Alto grau, fracamente diferenciado	

Coelho (2014), confirmando a relação entre graduação histológica e agressividade biológica, identificou incidência crescente de micrometástases em função do grau histológico do tumor primário, observando disseminação linfóide em todos os casos de carcinomas de grau III. Em estudo realizado com gatas, Campos et al (2016) verificou que aproximadamente 75% dos animais já estão nos graus II e III no momento da intervenção cirúrgica, e que a sobrevida média para animais com o grau histológico mais avançada é em torno de 100 dias.

2.2.3 Metástases

Os linfonodos são os primeiros e principais órgãos a desenvolverem metástases de neoplasias mamárias malignas, sendo registrado em gatas metástases de carcinoma tubulopapilar, carcinoma cribriforme, carcinoma sólido e carcinosarcoma (TOGNI et al, 2013).

Em cadelas, os linfonodos inguinais superficial, intratorácicos e axilares são, em ordem, os mais acometidos por metástase de carcinoma mamário. Os tipos histológicos mais prevalentes nas metástases para linfonodos são o carcinoma simples, o carcinosarcoma, o tumor misto maligno, o carcinoma complexo e o carcinoma em tumor misto. Os órgãos-alvo de metástases mais prevalentes são pulmão, fígado, coração, rim e glândula adrenal (OLIVEIRA FILHO et al. 2010).

A excisão dos linfonodos sentinelas durante o procedimento cirúrgico em pacientes com carcinomas mamários vem se tornando uma realidade também na medicina veterinária. Sendo utilizadas técnicas de coloração que facilitem sua identificação (LAVALLE et al 2017).

Em estudo realizado por Pinheiro et al (2003), utilizou-se corante azul patente associado a Tecnécio 99m para identificação de linfonodo sentinela em cadelas híginas, das 37 mamas analisadas, foram identificados 35 linfonodos corados e 2 não corados, contudo, todos os linfonodos foram identificados pelo gama-probe através da detecção da radiação. O que mostrou eficiência na utilização desta técnica na identificação do linfonodo sentinela da região subareolar de cadelas. Em outro estudo, a fluoresceína foi usada objetivando determinar a trajetória dos vasos linfáticos superficiais da glândula mamária em cadelas, demonstrando ser um método simples e rápido (RAHAL et al, 1995).

De 49 pacientes cadelas incluídas em estudo para avaliar técnica de coloração de linfonodo axilar e submeter o mesmo a análise histopatológica para identificação de metástase de neoplasia mamária, 98% das pacientes não apresentaram complicações na ferida cirúrgica, ou desconforto na região axilar e claudicação do membro torácico ipsilateral (BIANCHI, 2015).

Em mulheres, uma das técnicas praticadas é a mastectomia simples ou radical com o esvaziamento axilar, neste procedimento além de tecido mamário são excisados músculos e linfonodos regionais. Contudo, uma das complicações é o linfedema de membro superior, definido como um acúmulo

de linfa nos espaços intersticiais, causado pela destruição dos canais de drenagem axilar, provocados pela cirurgia e/ou radioterapia ou ainda pela progressão locorregional da doença (BERGMANN et al, 2004).

2.2.4 Estadiamento clínico

É estabelecido levando em consideração o tamanho da lesão primária (T), extensão de sua disseminação para linfonodos regionais (N), presença ou ausência de metástases à distância (M) (**Quadro 3**). A neoplasia deve ser aferida sempre pelo maior diâmetro, no caso de tumores multifocais ou multicêntricos, a medida é dada pelo maior tumor (BARROS et al, 2001). A utilização do TNM visa estabelecer um prognóstico e planejar um tratamento, bem como dar indicações precisas aos anatomopatologistas sobre o material enviado (CASSALI et al., 2013). O estadiamento clínico deve ser realizado de acordo com o sistema de estadiamento da Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980), modificado para neoplasias mamárias em felinos (BORREGO et al., 2009; MCNEILL et al., 2009).

Quadro 4: Estadiamento clínico da Organização Mundial da Saúde, modificado para tumores mamários felinos, de acordo com o sistema TNM (BORREGO et al., 2009; MCNEILL et al., 2009).

QUANTO AO TAMANHO (T)	LINFONODOS REGIONAIS (N)	METÁSTASES À DISTÂNCIA (M)
T ₁ : tumor < 2cm	N ₀ : Sem evidência de envolvimento de linfonodos regionais (axilares e inguinais)	M ₀ : Sem evidência de metástase distante
T ₂ : tumor 2 – 3cm	N ₁ : Linfonodo ipsilateral envolvido	M ₁ : Metástase distante incluindo linfonodos não-regionais
T ₃ : tumor > 3cm		
T ₄ : Tumor de qualquer tamanho (carcinoma inflamatório)		
ESTADIO	TNM	
I	T ₁ N ₀ M ₀	
II	T ₂ N ₀ M ₀	
III	T ₃ N _{0, 1} M ₀ / T _{1, 2} N ₁ M ₀	
IV	T _{1, 2, 3} N _{0, 1} M ₁	

Ito et al. (1996), em estudo sobre prognóstico de tumores mamários em 53 gatas verificou que o tempo médio de sobrevida foi de 8 meses e as taxas de sobrevida em 1 ano e 2 anos após o diagnóstico foram 31,8% e 17,7%, respectivamente. A média de sobrevivência de gatas com grandes tumores (T₃) foi de cinco meses, enquanto que aqueles com pequenos tumores (T₁ e T₂) sobreviveram nove meses. É sabido que o tamanho tumoral é um dos mais importantes fatores prognósticos já estabelecidos, acarretando em menor sobrevida global de pacientes que possuem grandes massas tumorais (FERREIRA et al., 2017).

Quando relacionado ao tempo de sobrevida de gatos com o estadiamento clínico, a taxa de sobrevida para os estádios I, II, III e IV foram de 29, 12,5, nove e um mês de vida, respectivamente (ITO et al 1996). Mais recentemente, De Campos et al. (2016) demonstraram que o diagnóstico, e consequente tratamento, ainda acontecem de forma tardia em gatas com neoplasia mamária, em estudo sobre fatores prognósticos demonstrou que 68% estavam em estágio III, 16% em estágio II e 16% em estágio I, o que inevitavelmente leva a uma menor sobrevida global do paciente com maior graduação clínica.

2.3 Biomarcadores para neoplasias mamárias

Segundo a literatura, a perspectiva de que algumas substâncias poderiam ser produzidas por tumores foi levantada pela primeira vez em 1847, quando Sir Bence Jones identificou uma proteína específica na urina de doentes com mieloma múltiplo. Ao longo dos anos as pesquisas se intensificaram e em 1965 e 1984 foram feitas as identificações do Antígeno Carcinoembrionário (CEA) e do Antígeno do Câncer 15.3 (CA15.3), respectivamente (ALMEIDA et al, 2007).

Estes marcadores são produtos de metabolismo celular normal, porém aumentam a produção devido a transformação maligna. São caracterizados por

substâncias presentes no tumor, sangue ou outros fluidos que são produzidos primariamente pelo tumor ou secundariamente em resposta à presença de tumores. Esses marcadores tumorais séricos refletem uma situação dinâmica e diferentes medições podem ser obtidas conforme necessário, diferentemente do que acontece com amostras de tecido tumoral primário (CAMPOS et al 2012).

Segundo Stieber et al (2015) o marcador ideal para fins de diagnóstico na oncologia deveria ter duas características: primeiro, ser secretado no sangue apenas em concentração mensurável após transformação maligna das células que a produzem; e segundo, a detecção dele permitiria conclusões sobre o local do tumor do qual ele surgiu. Contudo, apesar dos vários anos de pesquisa, ainda não existem marcadores tumorais específicos, ou seja, marcadores com 100% de especificidade (indetectáveis em doenças benignas e pessoas saudáveis) e 100% de sensibilidade (sempre detectáveis mesmo nos estágios iniciais do tumor).

Na medicina humana, o uso dos marcadores tumorais possuem inúmeras finalidades: diagnóstico diferencial em pacientes sintomáticos, estadiamento clínico, estabelecimento do diagnóstico, monitorização da eficiência terapêutica até a identificação de metástases e recidivas precocemente (ALMEIDA et al, 2007). Na medicina veterinária, o uso desta ferramenta diagnóstica para tumores de mama é bem recente, sendo realizado principalmente em cadelas (CAMPOS, 2010; GELALETI, 2011; BICALHO, 2012; CAMPOS et al, 2012).

2.3.1 Antígeno Carcinoembrionário (CEA)

O CEA é uma glicoproteína normalmente encontrada em epitélio endodérmico embrionário (CHEUNG et al, 2000). Na presença de adenocarcinomas de cólon, reto, mama e pulmão esse marcador tem produção aumentada. Pode ser utilizado para monitoramento de tratamento

antineoplásico, pois existe correlação positiva entre mudança de CEA sérico e respostas terapêuticas em pacientes com câncer de mama metastático (CHEUNG et al, 2000). A ocorrência de recidiva é indicada por um nível crescente de CEA, sendo clinicamente detectável quase sempre precedida de um aumento do marcador tumoral (ALMEIDA et al, 2007).

Em diferentes estudos, o CEA sérico esteve elevado em 30 a 50% dos pacientes com câncer de mama metastático sintomático (CHEUNG et al, 2000; STIEBER et al, 2015), já em ensaio realizado em cadelas com e sem tumor de mama o uso desse biomarcador não revelou diferença estatística entre os grupos (CAMPOS et al, 2012).

2.3.2 Antígeno do Câncer 15.3 (CA15.3)

É uma glicoproteína mucina de alto peso molecular (250-1000 kDa), codificada a partir do gene MUC1. Pode ser expressa por bexiga, pâncreas, ovário, trato respiratório e mamas. No tecido mamário normal, a MUC1 é expressa na superfície apical das células epiteliais nos ductos e ácinos, de onde a molécula é liberada através dos glóbulos de gordura do leite e, em forma solúvel, para o leite. No caso de tumores, a polarização celular é perdida e essa expressão alterada da superfície celular, associada à ruptura da arquitetura tecidual normal causada pelo tumor em crescimento, permite que a glicoproteína seja lançada na circulação onde pode ser medido por meio de imunoensaios (CHEUNG et al, 2000).

O CA 15.3 é o marcador tumoral sérico mais indicado para o monitoramento do câncer de mama. Este, por sua vez, é utilizado principalmente no diagnóstico precoce de recidivas e metástases, devido suas alterações séricas precederem os sinais clínicos em até 13 meses. O CA 15.3 também é empregado no monitoramento das pacientes durante o tratamento. A verificação dos níveis séricos deste marcador é proposta após duas a quatro semanas de tratamento cirúrgico e/ou início da quimioterapia, sendo realizada

repetição num intervalo que pode variar de três a seis meses (BENSOUDA et al, 2009).

Em estudo comparando os níveis séricos do CA 15.3 em cadelas, verificou-se correlação positiva entre o estadiamento clínico e a concentração do biomarcador. Animais que possuíam metástase em linfonodo regional ou a distância apresentaram diferença estatística quando comparados com aqueles que tinham tumores restritos apenas a cadeia mamária (CAMPOS et al, 2012).

2.3.3 Ciclo-oxigenase 2 (Cox-2)

A Ciclo-oxigenase-2 (Cox-2) é uma enzima que intervém na conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX) (DORÉ, 2011). Embora a Cox-2 possa contribuir para alguns processos fisiológicos, é essencialmente expressa em estados patológicos, principalmente em reações inflamatórias e medeia vários mecanismos, incluindo a proliferação celular, a apoptose, a resposta do sistema imune e a oncogênese (GROSCH et al, 2006).

A prostaglandina H2 é convertida numa reação de duas etapas, originando a partir de prostaglandina sintases específicas a PGE2, PGD2, PGF2 α , dentre outros. A expressão aumentada de Cox-2 parece está envolvida no desenvolvimento de câncer, promovendo a divisão celular, inibindo a apoptose, alterando a adesão celular e aumento de metástase e estimulação da neovascularização. A inibição da atividade da Cox-2 pelos tradicionais AINEs bloqueiam essas atividades (DORÉ, 2011).

Estudo realizado em gatas com tumores mamário, Sousa (2010) verificou uma marcação crescente de Cox-2 em lesões hiperplásicas, benignas e malignas, compatível com o que ocorre nas lesões mamárias em mulheres. O mesmo autor analisou estatisticamente dentro dos grupos histológicos diferenças na imunomarcação da enzima Cox-2 tanto na porcentagem de células marcadas quanto na intensidade, sendo a associação com maior

relevância a que ocorre entre o carcinoma sólido e o carcinoma cribriforme. Contudo, no carcinoma sólido foi verificada uma maior intensidade de marcação, o que leva ao seu maior poder de malignidade e consequentemente pior prognóstico (SOUSA, 2010).

A imunorreatividade para a Cox-2 em tumores mamários em cadelas, foi observada no citoplasma e membrana citoplasmática, de forma difusa e homogênea. A expressão de Cox-2 mostra-se mais elevada no grupo dos tumores malignos em comparação aos benignos, sendo esta diferença estatisticamente muito significativa, comprovada por Rodrigues (2014).

Hoje, ainda, associações estatísticas significativas entre a Cox-2 e diversas características clínico-patológicas, tais como o tamanho tumoral, a ulceração, a necrose, o índice mitótico e a presença de metástases nos linfonodos regionais. Conferindo a este marcador associação com parâmetros de malignidade e agressividade tumoral, tendo assim um prognóstico desfavorável (RODRIGUES, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estabelecer a caracterização clínico-patológica das neoplasias mamárias em gatas por meio da análise de Cox-2, CEA e CA15.3.

3.2 Específicos

Determinar a classificação histopatológica e grau histológico de tumores mamários em gatas.

Avaliar a expressão imunohistoquímica de Cox-2 em tumores mamários em gatas.

Quantificar as concentrações séricas de CA15.3 e CEA em gatas portadoras de tumores mamários.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Projeto de pesquisa submetido para análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA /UFRPE. Sendo autorizada a execução do projeto, sob número de licença 59/2017. Anexo 1.

4.1 Amostras

Foram acompanhados durante o período de junho a dezembro de 2017 os casos de gatas com tumores na cadeia mamária, atendidas no Hospital Veterinário da UFRPE e em clínicas particulares da região metropolitana do Recife. As amostras foram provenientes de 52 gatas, sendo obtido de modo não probabilístico por conveniência.

Como pontos de inclusão todos os animais deveriam ser da espécie *Felis catus* (gato doméstico), sexo feminino, com idade a partir de um ano, peso igual ou superior a 2kg, com lesões nodulares em região de cadeia mamária. Os animais foram avaliados clinicamente e através de exames hematológicos e de imagem para assegurar a realização de mastectomia.

Para cada animal foi preenchido um questionário com informações que incluíam idade, raça, se era castrada e quando o procedimento foi realizado e sobre o uso de hormônios anticoncepcionais.

Para determinação do estadiamento clínico das gatas, utilizou-se o método TNM, conforme BORREGO et al. (2009) e MCNEILL et al. (2009) **Quadro 4**, por isso foi realizada a medição de todos as neoplasias com auxílio de paquímetro (comprimento x largura x altura), sendo considerado a maior extensão. A pesquisa de metástase regional foi realizada naqueles animais que foi possível a excisão cirúrgica dos linfonodos, e a pesquisa a distância,

realizada através de análise radiográfica de tórax e ultrassonográfica de abdômen total.

Quadro 4: Estadiamento clínico da Organização Mundial da Saúde, modificado para tumores mamários felinos, de acordo com o sistema TNM (BORREGO et al., 2009; MCNEILL et al., 2009).

QUANTO AO TAMANHO (T)	LINFONODOS REGIONAIS (N)	METÁSTASES À DISTÂNCIA (M)
T ₁ : tumor < 2cm	N ₀ : Sem evidência de envolvimento de linfonodos regionais (axilares e inguinais)	M ₀ : Sem evidência de metástase distante
T ₂ : tumor 2 – 3cm	N ₁ : Linfonodo ipsilateral envolvido	M ₁ : Metástase distante incluindo linfonodos não-regionais
T ₃ : tumor > 3cm		
T ₄ : Tumor de qualquer tamanho (carcinoma inflamatório)		
ESTADIO		TNM
I		T ₁ N ₀ M ₀
II		T ₂ N ₀ M ₀
III		T ₃ N _{0, 1} M ₀ / T _{1, 2} N ₁ M ₀
IV		T _{1 2 3} N _{0 1} M ₁

4.2 Processamento histopatológico

As amostras foram fixadas em formol 10% tamponado, por no mínimo 48 horas. Em seguida foi realizada a análise macroscópica, que incluiu a medição das peças e dos nódulos com paquímetro (comprimento x largura x altura) e localização da mama acometida pela lesão nodular.

A etapa seguinte consistiu da clivagem dos nódulos em corte seccionais e paralelos. Para cada nódulo foram selecionados dois seguimentos com características macroscópicas distintas para realizar o processamento histopatológico de rotina, com impregnação em parafina e coloração em Hematoxila e Eosina (HE).

4.3 Classificação e graduação histopatológica

Após montadas, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico para definição da classificação histopatológica, sendo utilizada como referência a classificação proposta por Cassali et al (2018).

A graduação histopatológica das lesões malignas classificadas como carcinomas foi realizado conforme Elston & Ellis (1998), que leva em consideração formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica (Quadro 5).

Quadro 5: Graduação histológica de carcinomas mamários (Elston e Ellis, 1998).

PONTOS	FORMAÇÃO TUBULAR	PLEOMORFISMO NUCLEAR	ÍNDICE MITÓTICO
1	>75%	Discreto	0 – 7
2	10 – 75%	Moderado	8 – 16
3	<10%	Acentuado	>17
PONTUAÇÃO TOTAL		GRAU HISTOLÓGICO	
3 – 5		I – Baixo grau, tumor bem diferenciado	
6 – 7		II – Grau intermediário, moderadamente diferenciado	
8 – 9		III – Alto grau, fracamente diferenciado	

4.4 Técnica imunohistoquímica para Cox-2

Foram obtidos secções histológicas com espessura de 3,5µm depositadas em lâminas de vidro previamente preparadas para permitir maior fixação do tecido. A etapa inicial da técnica de imunohistoquímica foi realizada com o sistema *Trilogy (Cell Marque, Rocklin, USA)* em panela de pressão por dois minutos. Em seguida as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos com posterior lavagem em água corrente por cinco minutos e dois banhos em água destilada.

O bloqueio da peroxidase endógena tecidual foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio a 10 volumes e água destilada, na proporção de 1:1, em duas incubações de 15 minutos cada. Em seguida, os cortes foram lavados em água corrente por cinco minutos, seguido de banho rápido e imersão em PBS (pH 7.4) por cinco minutos.

Todos os cortes foram incubados em câmara úmida por 60 minutos com o anticorpo primário monoclonal anti-Cox 2 (clone SP21, *ThermoFisher*), na diluição de 1:80. Na sequência, as lâminas foram lavadas e colocadas em PBS e por cinco minutos.

Para todos os lâminas, foi realizada a incubação em câmara úmida com anticorpo secundário conjugado com polímero marcado com a enzima Horseradish Peroxidase (*EnVision™ + Dual Link System-HRP*) por 30 minutos à temperatura ambiente. Na sequência, foi realizada lavagem e imersão em PBS por cinco minutos, com posterior incubação em solução contendo o agente cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina; *Sigma Chemical CO, USA*) na concentração de 0,025 a 0,030mg em 100ml de PBS, com ativação pelo peróxido de hidrogênio a 10 volumes (600µl) e aplicação imediata nos cortes por cinco minutos e em câmara escura.

Na sequência, os cortes foram lavados rapidamente em PBS e, depois, em água corrente por cinco minutos. A seguir foi realizada a contra coloração com Hematoxilina de Harris por 45 segundos, seguido de lavagem em água corrente por cinco minutos, desidratação dos cortes em série crescente de etanol (70>90>100% - três minutos em cada) e imersão em dois banhos de xilol por três e cinco minutos, respectivamente. Por fim, foi realizada a montagem das lâminas para posterior avaliação da imunomarcação.

As lâminas foram observadas em microscópio eletrônico e escores de imunomarcação foi feita conforme Lavallo et al (2012): Observados em cinco campos microscópicos/aumento de 400x.

- Pontuação de distribuição:

0 = ausente; 1 = <10%; 2 = 10-30%; 3 = 31 a 60%; 4 > 61%

- Pontuação de intensidade: 0 = ausente; 1 = fraco; 2 = moderado; 3 = forte

A escore final da imunomarcação se dava pela multiplicação: escores de distribuição e intensidade: Marcação baixa: 0-5; Marcação alta: 6-12.

4.5 Amostras de sangue para testes séricos

Foi coletado por venopunção de cefálica ou jugular, 2 ml de sangue de 25 gatas submetidas ao procedimento cirúrgico para retirada de neoplasias mamárias. As amostras foram acondicionadas inicialmente em tubos sem anticoagulante e posteriormente foram centrifugadas para facilitar a separação do soro, estes foram então armazenadas em microtubos de 1,5 mL, identificadas e mantidas congeladas a -20°C até a realização dos testes. Como controle negativo foram utilizadas amostras de soro de 10 gatas clinicamente saudáveis.

4.6 Teste ELISA para quantificação de CA15.3 em amostras de soro

Para identificação e quantificação da glicoproteína mucina 15.3 como marcador tumoral as amostras de soro de gatas com tumores mamários foram submetidas ao teste CA15.3 ELISA IBL humano, que consiste num ensaio não competitivo de fase sólida baseado na técnica direta de *sanduíche*.

O teste foi executado em duplicata para calibradores, controles e amostras testadas. Todos os reagentes e amostras foram levadas à temperatura ambiente (18-26 °C) antes do uso. A execução do teste e cálculo dos resultados foram de acordo com o que preconiza o fabricante, sendo descrito abaixo.

1. Imediatamente antes do teste, foram preparadas as amostras diluindo com uma proporção de 1: 9 em diluente de Amostras fornecido.
2. Preparar 1X tampão de lavagem adicionando o conteúdo do frasco (25 ml, 20X) a 475 ml de água destilada ou desionizada água. Armazenar à temperatura ambiente (18-26 °C).
3. Dispensar 25 µl dos padrões CA15-3, amostras diluídas e controles diluídos nos poços apropriados.

4. Adicione 100 µl de reagente conjugado anticorpo-biotina (solução azul) a todos os poços. Misture delicadamente por 20-30 segundos a 500-600 rpm.

5. Incubar durante 60 minutos à temperatura ambiente.

6. Remover o líquido de todos os poços. Lavar os poços três vezes com 350 µL de tampão de lavagem 1X. Após cada lave, bater com firmeza a placa invertida em papel absorvente ou toalhas de papel para remover gotas residuais.

7. Dispensar 100 µL de Conjugado Enzimático (solução vermelha) em cada poço.

8. Incube durante 60 minutos à temperatura ambiente.

9. Remover o conteúdo do poço e lavar a placa 3x, 350 µL de tampão de lavagem 1X.

10. Dispensar 100µL de Solução TMB em cada poço.

11. Incubar em temperatura ambiente por 15 minutos.

12. Parar a reação adicionando 50 µL de Solução de Parada a cada poço.

13. Leitura da absorbância a 450nm com uma em 15 minutos espectrofotômetro de microplacas, realizada em equipamento *Thermo Scientific Multisan Go*.

14. Cálculo dos resultados: Foi construída uma curva de calibração em Excel, plotando a absorbância, os valores obtidos para cada calibrador em relação a concentração de CA 15.3 (em U/ml) fornecidos pelo teste, sendo gerada uma curva calibração padrão. As concentrações de CA 15.3 das amostras testadas foram definidas substituindo o valor de absorbância médio para cada espécime na curva de calibração padrão.

4.7 Teste ELISA para quantificação de CEA em amostras de soro

Para identificação e quantificação de CEA em amostras de soro de gatas com tumores mamários foi utilizado o teste ELISA CanAg CEA EIA humano, que consiste num ensaio não competitivo de fase sólida baseado na técnica direta de *sanduíche*.

O teste foi executado em duplicata para calibradores, controles e amostras testadas. Todos os reagentes e amostras foram levadas à temperatura ambiente (20–25 °C) antes do uso. A execução do teste e cálculo dos resultados foram de acordo com o que preconiza o fabricante, sendo descrito abaixo.

1. Preparação da Solução de Lavagem: Despeje o Concentrado de Lavagem de 50 mL em um recipiente limpo e dilua 25 vezes adicionando 1200 mL de água destilada ou desionizada para dar uma solução de lavagem tamponada.

2. Preparação da Solução de Anticorpo: Prepare a quantidade necessária de Solução de Anticorpo misturando 50 µL de Tracer, HRP Anti-CEA com 1 mL de Biotina Anti-CEA por tira.

3. Transferência do número necessário de tiras de microplaca para um quadro de tiras e posterior lavagem da tira uma vez com a solução de lavagem, 350 µL cada poço.

4. Pipetagem de 25 µl dos calibradores CEA (CAL 0, 2, 5, 15, 50, 75), controles e amostras desconhecidas nos poços de tiras.

5. Adição de 100 µL de Solução de Anticorpo a cada poço usando uma pipeta de precisão de 100 µl de 8 canais.

6. Incubação do quadro contendo as tiras por 1 hora (\pm 5 min) à temperatura ambiente (20–25 °C) com agitação constante.

7. Lavagem de cada tira 6 vezes, usando a solução de lavagem, 350 µL cada poço.

8. Adição de 100 µl de Substrato TMB HRP a cada poço. O Substrato TMB HRP deve ser adicionado ao poços o mais rapidamente possível e o tempo entre a adição ao primeiro e último poço não deve exceder 5 min.

9. Incubação por 30 min (\pm 5 min) à temperatura ambiente com agitação constante.

10. Leitura da absorbância a 620 nm em um espectrofotômetro de microplacas, realizada em equipamento *Thermo Scientific Multisan Go*.

11. Cálculo dos resultados: Para avaliação manual, foi construída uma curva de calibração em Excel, plotando a absorbância, os valores obtidos para cada calibrador em relação a concentração de CEA (em µg/L) fornecidos pelo teste, sendo gerada uma curva calibração padrão. As concentrações de CEA das amostras testadas foram definidas substituindo o valor de absorbância médio para cada espécime na curva de calibração padrão.

4.8 Análise estatística

Os dados foram tabulados em *Excel* 2013 e submetidos a avaliação descritiva e analisados quanto às frequências absoluta, relativa e médias. Foi utilizado também o programa estatístico *GraphPad Prism* 8.0.1 para cálculos e construção de gráfico com distribuição de média aritmética e desvio padrão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. R. C. et al. Marcadores tumorais: Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p305-316, 2007.
- BARROS, A. C. S. D. et al. **Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama**. Projeto Diretrizes, Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 15f. 2001.
- BENSOUDA, Y. et al. Prevalence of elevated serum CA 15-3 at time of metastatic relapse of breast cancer and correlation with hormone receptor status. **Bulletin du Cancer**, v. 96, n. 10, p. 923-928, 2009.
- BERGMANN, A. et al. Diagnóstico do linfedema: análise dos métodos empregados na avaliação do membro superior após linfadenectomia axilar para tratamento do câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 4, p. 311-320, 2004.
- BIANCHI, S. P. **Linfonodo axilar como sentinela de neoplasias mamárias de cadelas submetidas à mastectomia unilateral total**. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 52f, 2015.
- BICALHO, S. R. **Quantificação sérica do marcador tumoral CA 15.3 em cadelas híginas por quimioluminescência**. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 39f, 2012.
- BORREGO, J. F.; CARTAGENA, J. C.; ENGEL, J. Treatment of feline mammary tumours using chemotherapy, surgery and a COX-2 inhibitor drug (meloxicam): a retrospective study of 23 cases (2002–2007). **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 4, p. 213-222, 2009.
- CAMPOS, L. C. **Avaliação de marcadores tumorais séricos em cadelas com e sem metástase em câncer de mama**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Patologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 82f, 2010.
- CAMPOS, L. C. et al. CA15.3, CEA, and LDH in Dogs with Malignant Mammary Tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, p. 1383–1388, 2012.
- CAMPOS, C. B.; LAVALLE, G. E. & NUNES, F. C. Terapias complementares para o tratamento do câncer de mama. In: CASSALI, G.D. (Ed). **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, p. 185-188, 2017.
- CASSALI, G. D. et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 2, p. 38 – 69, 2013.

CHEUNG, K. L. et al. Tumor marker measurements in the diagnostics, monitoring of breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 26, p. 91–102, 2000.

COELHO, V. S. **Abordagem imuno-histoquímica otimiza a identificação de micrometástases nodais em cães portadores de carcinomas mamários**. Dissertação (Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental) - Universidade Paulista, São Paulo, 46f, 2014.

DAMASCENO, K. A. et al. Neoplasias benignas. In: CASSALI G.D. (Ed). **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, pp. 83-90, 2017.

CAMPOS, C. B et al. Evaluation of prognostic factors and survival rates in malignant feline mammary gland neoplasms. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18(12), p. 1003–1012, 2016.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of feline mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 55, n. 2, p. 1-17, 2018.

DORÉ, M. Cyclooxygenase-2 expression in animal cancers. **Veterinary pathology**, v. 48(1), p.254-265, 2011.

ELSTON, C. W. & ELLIS, I. O. The breast. In: ELSTON, C. W. & ELLIS, I. O. (eds.). **Systemic pathology**. London:Churchill Livingstone, p. 365-384, 1998.

FERREIRA, E. et al. Marcadores prognósticos e preditivos no câncer de mama. In: CASSALI, G.D. (Ed). **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, p. 141-149, 2017.

FIGUEIREDO, M. S.; **Castração pré-púbere em cães e gatos benefícios e riscos**. Monografia (Escola de Veterinária). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 44f. 2011.

FILGUEIRA, K. D. et al. Hiperplasia mamária felina: sucesso terapêutico com o uso do Aglepristone (Relato de caso). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1010-1016, 2008.

GAMBA, C. O. et al. Neoplasias malignas. In: CASSALI, G. D. (Ed). **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, p. 91-116, 2017.

GELALETI, G. B. **Avaliação da interleucinas 8 e 12, do CA 15-3 e DNA livre circulante como marcadores prognósticos no soro sanguíneo de cadelas com neoplasia mamária**. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Genética) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 100f, 2011.

GROSCH, S et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) - independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98(11), p. 736-747, 2006.

HASSAN, R. A. M; DÓRIA, M.T; BARACAT, E. C; FILASSI, J. R. Fatores preditivos de margens cirúrgicas comprometidas no tratamento do carcinoma ductal in situ da mama. **Revista Brasileira de Mastologia**. v. 27(1), p. 36-40. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Câncer de mama**. Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>>. Acessado em 26 de janeiro de 2019.

ITO, T. et al. Prognosis of malignant mammary tumor in 53 cats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58(8), p. 723 -726, 1996.

KOJIMA, H. et al. Apoptosis of pregnancy-dependent mammary tumor and transplantable pregnancy-dependent mammary tumor in mice. **Cancer Lett**, v.110, p.113-121, 1996.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the mamary gland. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. (Eds.). Withrow & MacEwen's **Small animal clinical oncology**. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2007. p. 619-636.

LANA, S. E. et al. Tumores de la glandula mamaria. In: WITHROW, S. J & VAILS, D.M. (Eds.) **Oncologia Clínica de pequenos animais**, 4 ed., Barcelona: Multimédica ediciones veterinárias, 2009. p. 605-622.

MATA, L. C. C. Marcadores séricos no câncer de mama In: CASSALI, G.D. (Ed). **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, p. 189-192, 2017.

MCNEILL, C. J. et al. Evaluation of adjuvant doxorubicinbased chemotherapy for the treatment of feline mammary carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 1, p. 123-129, 2009.

MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4.ed. Iowa State: Univ. California, 2002. 788p.

MISDORP, W. et al. **Mammary tumors of the dog and the cat**. Second series, volume VII. Armed Forces Institute of Pathology/ World Health Organization, Washington, D.C. 1999.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D. J. (Ed.), **Tumors in domestic animals**, 4 ed., Iowa: Iowa State Press, 2002. p. 575-606.

MORRISSON, W.B. Canine and feline mammary tumors. In: MORRISSON, W.B. (Ed.) **Câncer in dogs and cats: Medical and surgical treatment**. Baltimore :Williams & Wilkins, 1998. p.591-598.

NOGUEIRA, J. C. & CASTRO, C. S. Morfologia das glândulas mamárias (*Mammæ*) de Cadelas. In: CASSALI, G.D. (Ed). **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet. 2017. p. 1-13.

- OLIVEIRA, L. O. et al. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31(2), p.105-110, 2003.
- OLIVEIRA FILHO, J. C. et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 177-185 2010.
- OLIVEIRA, C. F. & SILVA T. S. Carcinoma ductal invasivo da mama: do diagnóstico ao tratamento cirúrgico. **Manual de Ginecologia**, v. 2, p. 247-288, 2011.
- OWEN, L. N. **TNM Classification of tumors in domestic animals**. Geneva: World Health Organization, 1980.
- PELETEIRO, M.C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.89, n.509, p. 10-28,1994.
- PIERCE, B. L. et al. Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. **Journal Clinical Oncology**, v.27, p.3437-3444, 2009.
- PINHEIRO, L. G. P. et al. Estudo experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e Tecnécio Tc99m. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18 (6), p. 514-517, 2003.
- QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 97, n. 543, p.119-127, 2002.
- RAHAL, S. C. et al. Uso da fluorsceína na identificação dos vasos linfáticos superficiais das glândulas mamárias em cadelas. **Ciência Rural**, v. 25, n. 2, p. 251-254, 1995.
- RODRIGUES, H. I. S. **Pesquisa de biomarcadores com potencial terapêutico nos tumores mamários da cadela: relevância da Cox-2, Ki-67 e Caspase-3**. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Biologia Clínica e Laboratorial) - Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro. 68f. 2014.
- SILVA, A. E. et al. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.625-633, 2004.
- SILVA, F. B. **Utilização de aglepristone no tratamento da hiperplasia mamária felina: relato de casos**. Monografia (Medicina Veterinária) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 39f. 2008.
- 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.
- SOUSA, R. P. M. **A expressão da COX-2 em patologias da glândula mamária da gata**. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Métodos Biomoleculares), Universidade de Aveiro. Aveiro, 80f, 2010.

STIEBER, P. et al. Diagnostic efficacy of CA 15-3 and CEA in the early detection of metastatic breast cancer – a retrospective analysis of kinetics on 743 breast cancer patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 448, p. 228-231, 2015.

TOBÍRIO, J. M. M. L. et al. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. **Revista Ceres**, v.59, n.4, p.427-433, 2012.

TOGNI, M. et al. Estudo retrospectivo de 207 casos de tumores mamários em gatas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33(3), p. 353-358, 2013.

Artigo submetida ao periódico **Acta Scientiae Veterinariae**

**Caracterização clínico-patológica e pesquisa de Cox-2, CEA e CA15.3 em
gatas com neoplasias mamárias**

Clinical-pathological characterization and investigation of Cox-2, CEA and
CA15.3 in cats with breast neoplasias

Amanda de Deus Ferreira Alves¹, Márcia de Figueiredo Pereira¹, Valdemiro

Amaro da Silva Junior¹

¹Área de Patologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco, Brasil. Programa de Pós Graduação em Biociência Animal – UFRPE, Recife – PE, Brasil. CORRESPONDENCE: Amanda de Deus Ferreira Alves [amanda_dedeus@hotmail.com]. Rua Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, 52171-900, Brasil.

ABSTRACT

Background: Breast neoplasms are the proliferative proteins that affect women, bitches, cats and are responsible for the death of certain substances around the world. Among the forms of diagnosis, the histopathological examination is considered the gold standard, being an example of histological analysis, degree of invasiveness of the neoplasia, mitotic index and other factors such as the presence of necrosis. It was not possible to investigate the presence of bacteria in the neoplastic tissue and no patients' blood.

Materials, Methods & Results: The aim of this study was to characterize the clinical-pathological characterization and the investigation of Cyclooxygenase 2 (COX-2),

Carcinoembryonic Antigen (CEA) and Cancer Antigen 15.3 (CA15.3) in cats with breast neoplasms. For each animal, information on the screening medium and blood samples for serum CEA and CA15.3 measurements were collected. To evaluate the clinical staging of cats, the TNM method was used, according to BORREGO et al. (2009) and MCNEILL et al. (2009). Samples obtained from mastectomy were fixed in 10% buffered and processed from the histopathological technique with impregnation in paraffin and staining in Hematoxyl and Eosin. The classification of the histological type was made according to Cassali et al (2018), a histopathological classification of lesions classified as carcinomas was performed according to Elston & Ellis (1998). To perform the immunohistochemical technique, antigen retrieval was achieved in a pressure cooker, with subsequent incubation with primary anti-Cox 2 antibody (clone SP21, ThermoFisher), at the 1:80 dilution and amplification from the polymer labeled with an enzyme Horseradish peroxidase (EnVision TM + Dual Link System-HRP). The determination of the immunostaining was performed according to Lavallo et al (2012), with an evaluation of the distribution and intensity of the labeling. For the quantification of CA 15.3 and CEA for the consumption of gángas were tested the ELISA human IBL ELISA and CanAg CEA human EIA ELISA tests, consist of non-competitive assays to support the direct sandwich technique. Thus, they were 81 breast tumors derived from 52 cats. Half of the animals had between 12 and 94.23% had no controlled race. In 55.77% of the cases, the tutor reported that at least one contraceptive application had been made, of which 79.31% developed malignant neoplasms. At the time of the surgical procedure, 60% of the engrams were already in the middle of episode III, in some cases with regional lymph node metastasis. As malignant neoplasms cross

82.71%, with cribriform, tubulopapillary and tubular types being more frequent, most of them in histopathological grade II (83.58%). Low immunolabeling was observed for Cox-2 and for CEA and CA15.3 concentration.

Discussion: Feline mammary carcinomas are recognized for their unfavorable prognosis because of a strong potential for recurrence and metastasis, and more than one histological type may coexist in animals with more than one nodule. Cribriform, tubulopapillary, tubular, and bone carcinomas are more common in cats. Its frequency of immunoreactivity of the neoplastic tissue is Cox-2 is important indicator of prognosis and predictability for the patient, being possible to complement the chemotherapy treatment than the greater survival to the patient. Regarding the use of biomarkers CA 15.3 and CEA, there is no pre-established reference value in veterinary medicine, it makes comparisons only between animals bearing mammary neoplasms and controlled animals. Another point is the inexistence of voltage supply kits for the measurement of CA15.3 and CEA in felines, now taking the tests in kits for humans.

Keywords: Tumor; carcinoma; breast; cats

Descritores: Tumor; carcinoma; mama; felinos

INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias nas gatas têm expressiva ocorrência, sendo o principal tipo de alteração neoplásica (OLIVEIRA FILHO et al, 2010; TOGNI et al, 2013). O processo neoplásico é complexo e multifatorial, envolve alterações genéticas, influência hormonal e tem importância crescente, as influências do microambiente tumoral que

relacionam os fatores pró e anti-inflamatórios, sendo a ciclo-oxigenase 2 uma enzima pró-inflamatória que pode participar deste processo (PIERCE et al, 2009).

Com os avanços da biologia molecular, surgem novas perspectivas visando a prevenção, diagnóstico precoce e tratamentos mais eficazes para as neoplasias mamárias. Nesse contexto, os biomarcadores tumorais, que são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente pelas células ou pelo tecido normal em resposta a presença do tumor, vêm sendo utilizados para monitoramento de recidivas e metástases em pacientes com neoplasias mamárias (MATA, 2017).

Desse modo, objetivou-se caracterizar histopatologicamente as neoplasias mamárias, bem como determinar a imunomarcacão para Cox-2 e os níveis séricos dos marcadores biológicos Antígeno Carcinoembrionário (CEA) e Antígeno do Câncer 15.3 (CA15.3) em gatas residentes na região metropolitana do Recife-PE.

MATERIAL E MÉTODOS

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA /UFRPE: autorizada a execucao do projeto, sob número de licença 59/2017.

Foram acompanhados durante o período de junho a dezembro de 2017, 52 gatas com tumores na cadeia mamária atendidas no Hospital Veterinário da UFRPE e em clínicas particulares da região metropolitana do Recife, sendo obtida amostra de modo não probabilístico por conveniência. Para cada animal foi preenchido um questionário com informações que incluíam idade, raça, se era castrada e quando o procedimento foi realizado e sobre o uso de hormônios anticoncepcionais.

Para determinação do estadiamento clínico das gatas, utilizou-se o método TNM, conforme BORREGO et al. (2009) e MCNEILL et al. (2009). As amostras provenientes de mastectomia foram fixadas em formol 10% tamponado e processadas com técnico histopatológico de rotina, com impregnação em parafina e coloração em Hematoxila e Eosina (HE). A classificação do tipo histológico foi feita de acordo com Cassali et al (2018). Já a graduação histopatológica das lesões classificadas como carcinomas foi realizado conforme Elston & Ellis (1998).

Para realização da técnica de imunohistoquímica a recuperação antigênica foi feita com o sistema *Trilogy* (*Cell Marque, Rocklin, USA*) em panela de pressão. Todos os cortes foram incubados em câmara úmida com o anticorpo primário monoclonal anti-Cox 2 (clone SP21, *ThermoFisher*), na diluição de 1:80. Para amplificação da ligação foi utilizado polímero marcado com a enzima Horseradish Peroxidase (*EnVision™+ Dual Link System-HRP*). A imunomarcação foi revelado pelo cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina; *Sigma Chemical CO, USA*) e contra corada com Hematoxilina de Harris. A determinação da imunomarcação foi realizada conforme Lavalley et al (2012), que avalia a distribuição e intensidade da marcação.

Para os teste de CA 15.3 e CA, foram coletados 2 ml de sangue de 25 gatas antes da realização da mastectomia, sendo posteriormente aliquoteado o soro e armazenado em microtubos de 1,5 ml. Como controle negativo foram utilizadas amostras de soro de 10 gatas clinicamente saudáveis.

Para quantificação do CA 15.3 e CEA utilizou-se os testes *ELISA IBL humano* e *ELISA CanAg CEA EIA humano*, respectivamente, que consistem em ensaios não

competitivos de fase sólida baseados na técnica direta de *sanduíche*. Os testes foram executados em duplicata para calibradores, controles e amostras testadas. A leitura das microplacas de ELISA foi realizada no equipamento *Thermo Scientific Multisan Go*, a 450nm para o CA 15.3 e 620nm para o CEA. A execução do teste e cálculo dos resultados foram de acordo com o que preconiza o fabricante.

Os dados foram tabulados em *Excel 2013* e submetidos a avaliação descritiva e analisados quanto às frequências absoluta, relativa e médias. Foi utilizado também o programa estatístico *GraphPad Prism 8.0.1* para cálculos e construção de gráfico com distribuição de média aritmética e desvio padrão.

RESULTADOS

O grupo de estudo foi composto por 52 gatas, 94,23% não possuíam raça definida. A idade variou de seis meses a 16 anos, sendo a média 8,5 anos e a moda 12 anos. A faixa etária entre oito e 12 anos concentrou a maior parte dos animais, conforme exposto na **Tabela 1**.

Tabela 1: Frequência absoluta e relativa das variáveis idade e raça de gatas com tumores mamários.

IDADE						
	Até 3 anos	4 a 7 anos	8 a 12 anos	Acima de 12 anos	Não respondeu	Total
FA	4	10	26	8	4	52
FR%	7,69	19,23	50,00	15,38	7,69	100
RAÇA						
	Sem raça definida (SRD)			Siamês		
FA	49			3		52
FR%	94,23			5,77		100

Das gatas que participaram deste estudo, 57,69% eram castradas sendo que 20% desse total foram submetidas a este procedimento de forma eletiva. Nas demais, o procedimento de esterilização foi realizado durante outros procedimentos cirúrgicos anteriores, como cesariana (16,67%), histerectomia decorrente de piometra (16,67%) ou durante a mastectomia (30%).

Em relação ao uso de hormônio exógeno para inibição do cio, os tutores relataram uso em 55,77% dos animais, sendo em muitos casos usado de forma contínua por vários anos. Dos animais que foram submetidos a ação hormonal, 20,68% desenvolveram lesões mamárias hiperplásicas e 79,31% neoplasias malignas (**Tabela 2**).

Tabelas 2: Frequência absoluta e relativa sobre a realização de castração e uso de anticoncepcionais em gatas tumores mamários.

		FA	FR%		FA	FR%
Castração	Sim	30	57,69	Eletiva	6	20
				Parto	5	16,67
				Histerectomia	5	16,67
				Mastectomia	9	30
				Não sabe	5	16,67
	Não	10	19,23			
	Não respondeu	12	23,08			
Total		52	100			
Uso de anticoncepcional	Sim	29	55,77	Lesão benigna	6	20,69
				Lesão maligna	23	79,31
	Não	12	23,08			
	Não respondeu	11	21,15			
Total		52	100			

Pelo fato de vários animais terem mais de um nódulo mamário no momento do diagnóstico, a quantidade de amostras analisadas totalizou 81 tumores. Destas 39,51% tinham menos de 2 cm, 22,22% estavam entre 2 e 3 cm, e 38,27% eram maiores que 3 cm (**Tabela 3**). Levando-se em consideração a graduação clínica das pacientes com neoplasias, obtida a partir do sistema TNM, 60% das gatas estavam em grau III no momento da intervenção cirúrgica, 24,44% grau I e 15,56% grau II, sendo este parâmetro, neste estudo, influenciado principalmente pelo tamanho tumoral e presença de metástase regional. Nenhuma das gatas possuíam metástase a distância no momento do procedimento cirúrgico.

Tabela 3: Frequência absoluta e relativa do tamanho tumoral e estadiamento clínico (TNM) das gatas com tumores mamários.

Tamanho	FA	FR%	TNM	FA	FR%
T1	32	39,51	I	11	24,44
T2	18	22,22	II	7	15,56
T3	31	38,27	III	27	60
			IV	0	0
Total	81	100	Total	45	100

As neoplasias malignas representaram 82,71% dos tumores. Sendo os tipos cribriforme e tubulopapilar os mais frequentes dentre os malignos. As alterações proliferativas não neoplásicas somaram 17,28% dos casos, sendo a principal delas a hiperplasia fibroepitelial. Os demais tipos histológicos classificados estão dispostos na **Tabela 3**. Na **Figura 1** é possível observar a fotomicrografia de alguns tipos histopatológicos.

Tabela 3: Diagnóstico histopatológico de tumores mamários em gatas

CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	FA	FR%	Não neoplásico FR%	Malignos FR%
Carcinoma Cribriforme	24	29,63	-	35,82
Carcinoma Tubulopapilar	18	22,22	-	26,87
Carcinoma Tubular	11	13,58	-	16,42
Carcinoma Sólido	10	12,35	-	14,93
Carcinoma Micropapilar	1	1,23	-	1,49
Carcinossarcoma	1	1,23	-	1,49
Carcinoma de Células Escamosas	1	1,23	-	1,49
Carcinoma Papilar	1	1,23	-	1,49
Hiperplasia Fibroepitelial	12	14,81	85,72	-
Ectasia Ductal	2	2,47	14,28	-
Total	81	100	100	100

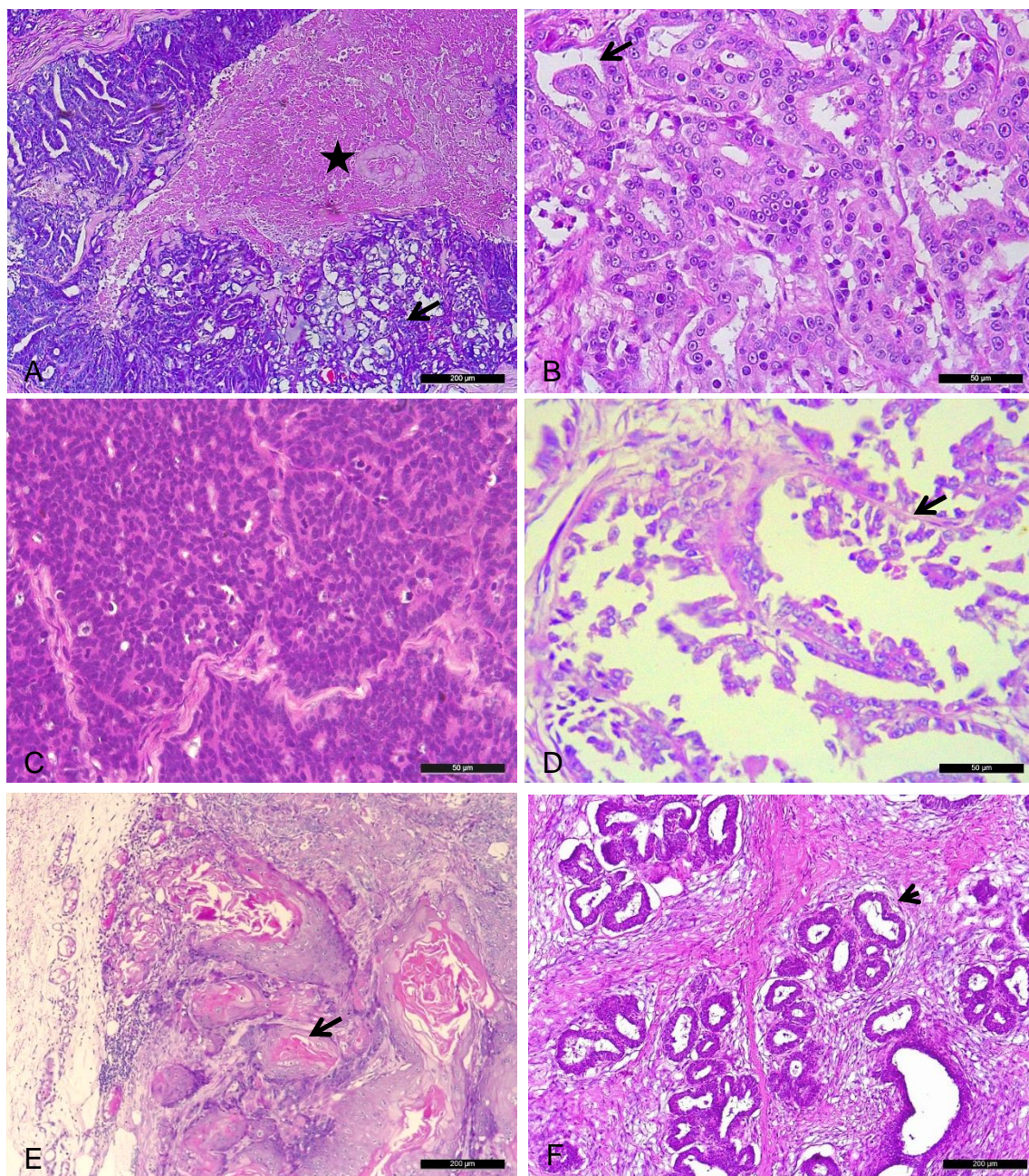


Figura 1: Fotomicrografia de tumores mamários em gatas. (A) Carcinoma cribriforme. Proliferação epitelial originando pseudolumens (seta) com extensa área de necrose (estrela). HE, 100x. (B) Carcinoma tubulopapilar. Células epiteliais originando estruturas tubulares com projeções papilares (seta). HE, 400x. (C) Carcinoma sólido. Células epiteliais distribuídas na forma de manto. HE, 400x. (D) Carcinoma micropapilar. Projeções de micropapilas a partir de delicado feixe fibroso (seta). HE, 400x. (E) Carcinoma de células escamosas. Observar a formação de pérolas córneas (seta). HE, 100x. (F) Hiperplasia fibroepitelial. Estroma fibroso com proliferação epitelial originando estruturas tubulares (cabeça de seta). HE, 100x.

Em algumas amostras foram encaminhados além do tumor os linfonodos regionais, sendo avaliados histopatologicamente 27 linfonodos, dois localizados na região axilar e 25 na região inguinal. Em 12 linfonodos (44,44%) foi detectada a presença de metástase de carcinoma mamário, sendo observados os tipos cribriforme (41,66%), tubulopapilar (25%), tubular (16,66%), sólido (8,33%) e papilar (8,33%)

A graduação histopatológica para os carcinomas mamários, determinada conforme Elston & Ellis (1998), teve maior frequência de casos concentrada no grau II (83,58%), seguido do grau I (14,93%) e apenas um caso em grau III (1,49%).

As células neoplásicas imunomarcadas com o anticorpo anti Cox-2 mostraram marcação intracitoplasmática. O tipo histopatológico papilar foi o que mostrou uma maior marcação nas células neoplásicas, porém, de modo geral todas as imunomarcações anti Cox-2 foram baixas. Não foram observadas variações na imunomarcação em relação a graduação histopatológica do tumor. Em muitos casos, a presença de marcação positiva só foi observada em células de infiltrado inflamatório, região intersticial em fibroblastos e em endotélio vascular (**Figura 2**).

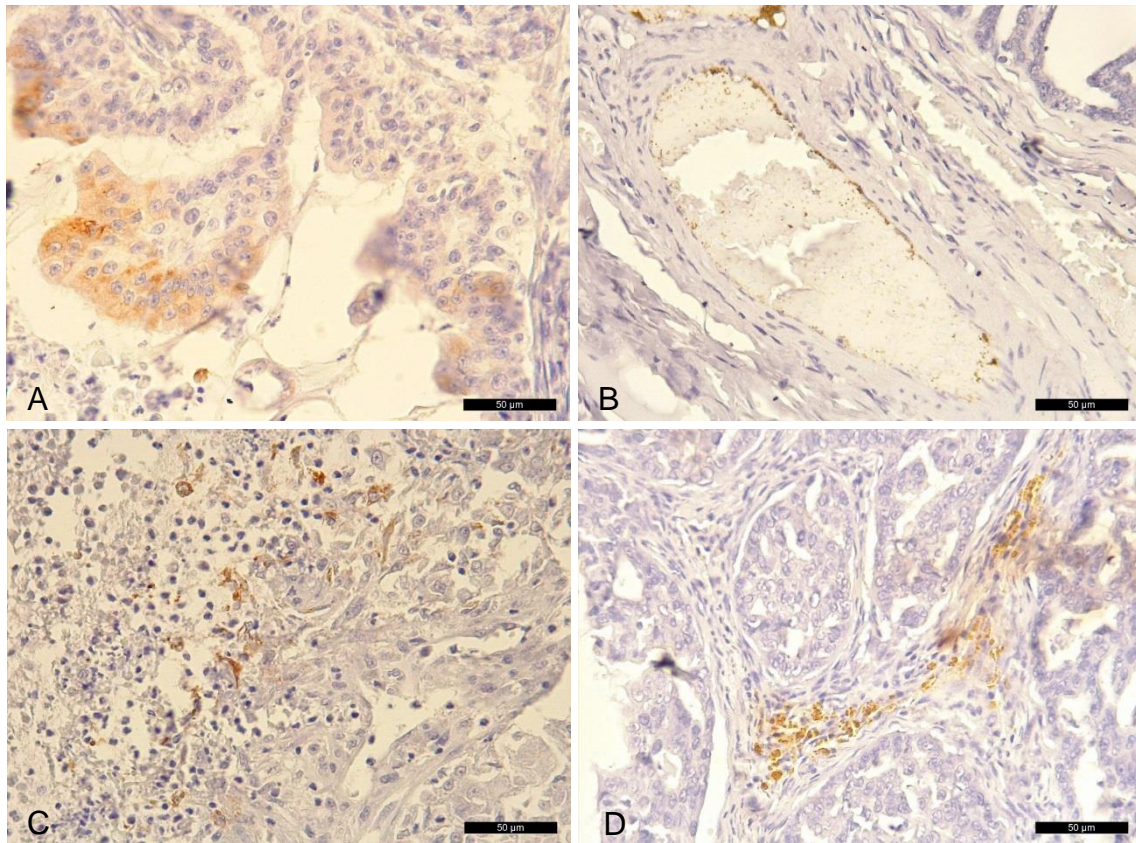


Figura 2: Fotomicrografia da imunomarcção para Cox-2 em neoplasias mamárias. (A) Marcação moderada em carcinoma papilar. (B) Marcação positiva em endotélio vascular. (C) Marcação positiva em células inflamatórias. (D) Marcação positiva em fibroblastos do espaço intersticial. 400x.

A média das concentrações séricas de CA 15.3 das gatas com neoplasias mamárias foi 2,4108 U/ml, com desvio padrão de 0,4748, se equiparando ao calibrador 0 do teste (2,3610 U/ml). Já para os animais selecionados como controle a média de concentração foi igual a 2,4628 U/ml, com desvio padrão de 0,3803 U/ml. Comparando as médias dos animais testados e dos controles, não houve diferença expressiva entre os grupos (**Figura 3**). A média das concentrações séricas de CEA das gatas com neoplasias

mamárias foi de 0,0024 µg/L, todos os resultados tiveram concentração de CEA abaixo do calibrador 0 do teste. (**Figura 4**).

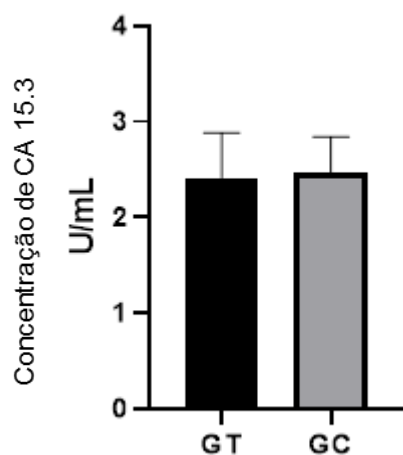


Figura 3: Média e desvio padrão da concentração de CA 15.3 U/ml em grupo tumores (GT) e grupo controle (GC).

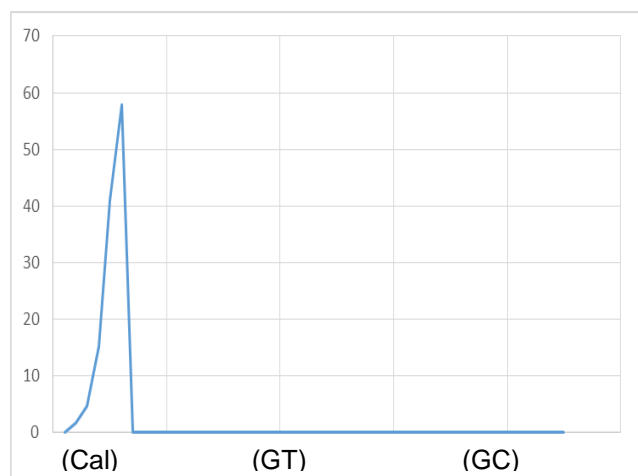


Figura 4: Concentração de CEA µg/L, incluindo calibradores do teste (Cal), grupo tumores (GT) e grupo controle (GC).

DISCUSSÃO

Os tumores mamários estão sempre entre os três tipos mais prevalentes em gatas (TOGNI et al 2013). Togni et al (2013) corrobora que a faixa etária que alberga o maior número de casos é a partir dos 8 anos de idade. A grande quantidade de tumores mamários associados a gatas não-castradas, bem como a ocorrência de lesões mamárias após aplicação de progestinas sintéticas demonstra o importante papel dos hormônios ovarianos em neoplasias mamárias felinas. No presente estudo, 79,31% dos animais expostos ao uso de contraceptivos hormonais desenvolveram neoplasia maligna.

O estadiamento clínico estabelecido pelo do sistema TNM sofre grande influência do tamanho do tumor, pois tumores com escore T3 já são considerados TNM III, independente de terem metástase regional ou a distância. Os valores estabelecidos

para os pacientes deste estudo foram semelhantes a Campos et al (2016), sendo o estágio III o mais frequente em pacientes felinos com tumor de mama.

De acordo com Medeiros et al (2016) que avaliou a hiperplasia mamária em 43 gatas, esta caracteriza-se como uma alteração comum em gatas jovens, principalmente se submetidas à terapia contraceptiva, e que o desfecho clínico é favorável se a terapêutica for instituída de forma precoce e correta. Neste estudo a hiperplasia fibroepitelial felina representou 13,58% de todos os casos, sendo 75% destes animais submetidos a pelo menos uma aplicação de hormônio anticoncepcional.

A neoplasia mamária quando presente em gatas geralmente tem características malignas, sendo 82,71% dos casos classificados como carcinomas, valor muito semelhante ao determinado por Costa (2010) e Togni et al (2013).

Os carcinomas mamários felinos são conhecidos pelo seu prognóstico desfavorável devido a uma forte tendência para recidiva e metástase, podendo ainda coexistir mais de um tipo histológico em animais que possuem mais de um nódulo (MISDORP et al, 1999). Os tipos histológicos cribriforme, tubulopapilar, tubular e sólido são considerados os mais comuns em gatas (TOGNI et al, 2013). Os tipos micropapilar, carcinossarcoma e o carcinoma de células escamosas são considerados mais raros (CAMPOS et al, 2016).

O linfonodo regional é o primeiro local de desenvolvimento de metástases de carcinomas mamários, isto em decorrência da drenagem linfática local, onde células neoplásicas podem se implantar e estabelecer novos nódulos. Os tipos histológicos cribriforme e tubulopapilar foram os que comumente provocaram metástase para

linfonodo regional, corroborando Togni et al (2013) e Campos et al (2016). Contudo, esses são os tipos mais comumente descritos de carcinomas mamários em gatas, deste modo, a maior quantidade de metástases poderia ser em consequência dessa maior frequência.

Corroborando com este estudo, Campos et al (2016) verificou que a maioria dos carcinomas mamários são caracterizados na graduação histopatológica II. A interpretação do grau histológico como fator prognóstico em carcinomas mostra forte correlação positiva do alto grau com pior sobrevida das pacientes. É descrita também uma relação direta entre tumores de grau histológico mais agressivo e a ocorrência de invasão vascular e disseminação metastática (FERREIRA et al, 2017).

A expressão imunohistoquímica aumentada de Cox-2 é relacionada a fatores prognósticos desfavoráveis, como tamanho tumoral, tipo histológico mais agressivo, maior potencial metastático para linfonodos e alto grau histológico (FERREIRA et al 2017), além de grande relação com a angiogênese tumoral, com reação com o endotélio vascular, facilitando o desenvolvimento e progressão neoplásica.

Em gatas, a imunomarcção para Cox-2 variou de moderada a intensa em neoplasias benignas e malignas, respectivamente (SOUSA, 2010). Já em pesquisa realizada por Campos et al (2016), cerca de 71% das neoplasias mamárias malignas em gatas tiveram baixa marcação para Cox-2, sendo os carcinomas sólido e cribriforme os de maior marcação. Desse modo, a imunoexpressão para Cox-2 se mostra bem variada nos diferentes estudos publicados.

Neste estudo, a marcação para Cox-2 foi mais evidente no carcinoma papilar, onde algumas células epiteliais tiveram marcação citoplasmática em intensidade moderada. Nos demais tipos histológicos a imunomarcação foi restrita a poucas células epiteliais, células inflamatórias com predomínio de linfócitos e em áreas de estroma fibrovascular.

Tratamentos mais eficazes e detecção precoce são recursos essenciais para a redução tanto da mortalidade quanto da morbidade decorrente dos processos neoplásicos. Neste sentido, os marcadores tumorais constituem importantes ferramentas auxiliares na oncologia (MATA, 2017). A elevação dos marcadores tumorais pode ser o primeiro sinal de recorrência. Em teste realizado em mulheres com carcinoma ductal invasor, foi verificada positividade do marcador CA 15.3 em 8% das pacientes e em 4,8% para o CEA (MENDES; STURMER & BASEGIO, 2010).

Em cadelas, na análise do marcador tumoral CA 15.3 pode-se observar, no grupo teste, que os valores obtidos na análise das amostras variaram entre 1 e 2,4 U/ml nas amostras pré-mastectomia, entre 0,09 e 0,9 U/ml nas pós-mastectomia, se equiparando aos valores do grupo controle (0,09 e 0,7 U/ml) (ROBERTO; ZILLOTTO & SEKI, 2018). Em outro estudo utilizando a mesma técnica, cadelas com neoplasias mamárias tiveram como média de concentração $1,868 \text{ U/ml} \pm 0,267$ (GELALETI, 2011).

O fato de não haver valor de referência pré-estabelecido na medicina veterinária para os biomarcadores CA 15.3 e CEA, faz com que comparações sejam realizadas apenas entre animais portadores das neoplasias mamárias e animais controles. Para gatas a escassez de dados é ainda maior, não sendo encontrado nenhum outro trabalho

que tenha pesquisado tais biomarcadores para o câncer de mama nesta espécie. Outro ponto a ser comentando é a inexistência de *kits* comerciais ELISA voltados para mensuração de CA15.3 e CEA em caninos e felinos, sendo realizados os testes em *kits* para humanos.

A baixa expressividade das concentrações de CA 15.3 e CEA encontradas neste estudo, sugere que pode haver diferenças entre os antígenos humanos e das gatas, levando a uma baixa expressão, ou ainda, pode-se supor que o CA 15.3 e o CEA não se caracterizem como biomarcadores efetivos para diagnóstico e monitoramento de neoplasias mamárias em gatas.

CONCLUSÃO

De modo geral, os carcinomas mamários são os mais frequentes nas gatas, sendo verificada baixa imunomarcção para Cox-2 e para a concentração de CEA e CA15.3. Porém, a detecção da Cox-2 nos fragmentos de tumores mamários em gatas, não teve relação direta com o prognóstico. Os testes para os marcadores CA 15.3 e CEA, quando realizados a partir de kits para humanos, não devem ser utilizados como indicadores para detecção de neoplasias mamários em gatas, devido à baixa sensibilidade e ou especificidade do teste.

REFERÊNCIAS

BORREGO, J. F.; CARTAGENA, J. C.; ENGEL, J. Treatment of feline mammary tumours using chemotherapy, surgery and a COX-2 inhibitor drug (meloxicam): a

retrospective study of 23 cases (2002–2007). **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 4, p. 213-222, 2009.

CAMPOS, L. C. **Avaliação de marcadores tumorais séricos em cadelas com e sem metástase em câncer de mama**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Patologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 82f, 2010.

CAMPOS, L. C. et al. CA15.3, CEA, and LDH in Dogs with Malignant Mammary Tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, p. 1383–1388, 2012.

CAMPOS, C. B.; LAVALLE, G. E. & NUNES, F. C. Terapias complementares para o tratamento do câncer de mama. In: CASSALI, G.D. (Ed). **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, p. 185-188, 2017.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 2, p. 38 – 69, 2013.

COSTA, M. M. **Estudo epidemiológico e anatomo-patológico de tumores mamários na cadela e na gata**. Dissertação (Mestrado integrado em medicina veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 135f, 2010.

COSTA JR, J. S. et al. Estudo epidemiológico de tumores de mama em cadelas na região do oeste paulista. **Colloquium Agrariae**, v. 12, n.1, p.27-31, 2016.

CAMPOS, C. B et al. Evaluation of prognostic factors and survival rates in malignant feline mammary gland neoplasms. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18(12), p. 1003–1012, 2016.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of feline mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 55, n. 2, p. 1-17, 2018.

ELSTON, C. W. & ELLIS, I. O. The breast. In: ELSTON, C. W. & ELLIS, I. O. (eds.). **Systemic pathology**. London:Churchill Livingstone, p. 365-384, 1998.

FERREIRA, E. et al. Marcadores prognósticos e preditivos no câncer de mama. In: CASSALI, G.D. (Ed). **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, p. 141-149, 2017.

GELALETI, G. B. **Avaliação da interleucinas 8 e 12, do CA 15-3 e DNA livre circulante como marcadores prognósticos no soro sanguíneo de cadelas com neoplasia mamária**. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Genética) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 100f, 2011.

MATA, L. C. C. Marcadores séricos no câncer de mama In: CASSALI, G.D. (Ed). **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, p. 189-192, 2017.

MCNEILL, C. J. et al. Evaluation of adjuvant doxorubicinbased chemotherapy for the treatment of feline mammary carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 1, p. 123-129, 2009.

- MEDEIROS, L. K. G. et al. Hiperplasia mamária em felinos - estudo retrospectivo. **Anais**. 37ºANCLIVEPA, p.1010- 1013, 2016.
- MENDES, G. A.; STURMER, F. C. R.; BASEGIO, D. L. Utilização dos marcadores CA 15.3 e CEA no seguimento de pacientes com neoplasia mamária. **NewsLab**. 102 ed. p. 120-126, 2010.
- MISDORP, W. et al. **Mammary tumors of the dog and the cat**. Second series, volume VII. Armed Forces Institute of Pathology/ World Health Organization, Washington, D.C. 1999.
- OLIVEIRA FILHO, J. C. et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 177-185 2010.
- PIERCE, B. L. et al. Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. **Journal Clinical Oncology**, v.27, p.3437-3444, 2009.
- ROBERTO, G. B.; ZILIOTTO, L. & SEKI, M. C. Avaliação comparativa de dosagem do marcador tumoral CA 15-3 em cadelas híginas ou com neoplasia mamária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1800-1807, 2018.
- SOUSA, R. P. M. **A expressão da COX-2 em patologias da glândula mamária da gata**. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Métodos Biomoleculares), Universidade de Aveiro. Aveiro, 80f, 2010.
- TOGNI, M. et al. Estudo retrospectivo de 207 casos de tumores mamários em gatas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33(3), p. 353-358, 2013.


APÊNDICE

Projeto de Pesquisa: “Estudo clínico-patológico e epidemiológico dos tumores mamários em cadelas e gatas atendidas em clínicas veterinárias particulares na Região Metropolitana do Recife”

Avaliação de tumores mamários em caninos e felinos

Nome:	Espécie: <input type="checkbox"/> can <input type="checkbox"/> fel	Data: __/__/__
Tutor:	Raça:	Peso: _____
Telefone:	Idade:	M²: _____
Endereço:		

Tempo de evolução: _____	O paciente recebeu algum tratamento? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Cirurgia <input type="checkbox"/> cirurgia + quimioterapia <input type="checkbox"/> Quimioterapia <input type="checkbox"/> Outro: _____
Score corporal: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Baixo peso <input type="checkbox"/> Sobrepeso O paciente perdeu peso ultimamente? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim quanto? _____	Data da cirurgia anterior: __/__/____ Diagnóstico prévio: _____

Histórico reprodutivo	
Ciclo estral: <input type="checkbox"/> Regular <input type="checkbox"/> < 6 meses <input type="checkbox"/> > 6 meses	OSH: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Eletiva <input type="checkbox"/> Parto <input type="checkbox"/> Piometra <input type="checkbox"/> Outro: _____
Uso de hormônios: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Qual medicação? _____ Quantas vezes? _____ Objetivo/motivo? _____ Qual medicação? _____ Quantas vezes? _____ Objetivo/motivo? _____	Pseudogestação <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Quantas vezes? _____ Secreção láctea? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Fez tratamento? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Quantas vezes? _____ Secreção láctea? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Fez tratamento? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Ninhadas: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Quantas? _____	
Histórico de lesão mamária na família: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Quais? _____ Pesquisa de metástase <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Onde? _____	

Exame físico das glândulas mamárias						
Glândula Mamária	Tamanho	Consistência	Tumor	Secreção	Ulceração	Linfonodos Envolvidos
T1						
T2						
A1						
A2						
I						
D – Direita E – Esquerda	1 - <3,0 cm 2 - 3,0-5,0 cm 3 - >5,0 cm	1 - Firme 2 - Macio 3 - Elástico	1 – Não fixado 2 – Fixado na Pele 3 – Fixado no músculo	1 – Sim 2 – Não	1 – Sim 2 – Não	1 – Axilar 2 – Inguinal 3 – Nenhum

Estadiamento clínico preliminar T _____ N _____ M _____ EC _____
Tratamento Cirúrgico: <input type="checkbox"/> Lumpectomia <input type="checkbox"/> Mastectomia - <input type="checkbox"/> Bilateral <input type="checkbox"/> Unilateral <input type="checkbox"/> Unilateral parcial
Tratamento Clínico: <input type="checkbox"/> Quimioterapia neoadjuvante <input type="checkbox"/> Quimioterapia adjuvante <input type="checkbox"/> Quimioterapia metronômica Protocolo Quimioterápico: _____ <input type="checkbox"/> Tratamento paliativo - Tipo: _____
Resultados anatomopatológicos: (preenchimento de responsabilidade do Laboratório) Diagnóstico da lesão da glândula mamária: _____
Metástase no Linfonodo Regional? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim - Qual Linfonodo? _____

Estadiamento Clínico Definitivo:

T _____ N _____ M _____