

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ULTRASSONOGRAFIA CONVENCIONAL E MODO DOPPLER EM CORES E  
POWER NA AVALIAÇÃO DA NEOPLASIA MAMÁRIA EM CADELAS**

**Marcus Antonio Rossi Feliciano**

MSc Médico Veterinário

Jaboticabal - São Paulo - Brasil  
Dezembro – 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ULTRASSONOGRAFIA CONVENCIONAL E MODO DOPPLER EM CORES E  
POWER NA AVALIAÇÃO DA NEOPLASIA MAMÁRIA EM CADELAS**

Marcus Antonio Rossi Feliciano

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal – UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

Jaboticabal - São Paulo - Brasil  
Dezembro – 2010

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MARCUS ANTONIO ROSSI FELICIANO** - nascido em 23 de outubro de 1980, em São Sebastião do Paraíso – MG. Médico Veterinário formado pela Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, Minas Gerais, em julho de 2004. No período de fevereiro de 2005 a fevereiro de 2007 cursou Pós-Graduação com Especialização em Residência Médico-Veterinária na área de Diagnóstico por Imagem em Pequenos Animais, pela UFLA. Em fevereiro de 2007 ingressou no Mestrado pelo programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFLA, concluindo em janeiro de 2008. Em março de 2008 iniciou o doutoramento em Medicina Veterinária na área de Reprodução Animal, pela Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), câmpus Jaboticabal onde atua no Setor de Obstetrícia e Reprodução.

Minha alma glorifica ao Senhor,  
meu espírito exulta de alegria em Deus  
meu salvador,  
porque olhou para sua pobre serva,  
por isto desde agora e para sempre me  
chamarão bem aventurada todas as  
gerações,  
porque realizou em mim maravilhas  
Aquele que é poderoso e cujo nome é  
Santo.  
Sua misericórdia se estende de  
geração em geração sobre todos que O  
temem.  
Manifestou o poder do seu braço;  
desconcertou os corações dos  
soberbos.  
Derrubou do trono os poderosos  
e exaltou os humildes.  
Saciou de bens os famintos  
e despediu de mãos vazias os ricos.  
Acolheu a Israel, seu servo, lembrando  
de sua misericórdia,  
conforme prometera a nossos pais, em  
favor de Abraão e sua posteridade,  
para sempre. Amém

“Magnificat – Lc 1, 46b - 55”

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por seu amor incondicional por mim e todos que amo. Agradeço a Ele por me abençoar todos os dias com minha vida, permitindo que eu tenha uma família maravilhosa, amigos únicos, momentos inesquecíveis na minha história, aprendizados, alegria, saúde, paz, disposição e esperança. Obrigado, meu Deus, por se fazer tão vivo em minha vida, na presença de Nosso Senhor Jesus Cristo.

Agradeço a Maria Santíssima, por olhar para minhas necessidades e, junto ao seu Filho, interceder com carinho e misericórdia.

Aos meus pais. Sempre incentivaram meus estudos, mesmo diante de nossas dificuldades e limitações. Nos momentos de medo, angústia e sem esperança foram fundamentais no apoio para sempre continuar e ter fé. Hoje são, junto aos meus sobrinhos, os presentes mais valiosos que tenho de Deus. Meus exemplos de integridade, verdade e amor.

Aos meus sobrinhos. Percebo o valor da continuidade de vida por meio deles. Ao Fredderico, Jéssica, Mônica e Ottávio, meu carinho por serem os motivos pelos quais busco vencer na vida.

Aos meus avôs e avós, Miceno, Geraldino, Vicentina e Marcionilia. Em especial à minha avó Vicentina, que não se encontra mais entre nós. Agradeço a ela por ser minha segunda mãe, me proteger, dar carinho e por ter sido uma grande companheira durante nossa convivência.

Agradeço aos meus tios e tias, primos e primas, em especial ao meu tio Francisco, que confiou na minha capacidade e auxiliou consideravelmente em meus estudos.

Ao meu amigo, professor Wilter Ricardo Russiano Vicente. Um exemplo de ser humano, amigo e orientador. Sempre disponível, presente, acreditando em mim e nos outros orientados, dando total liberdade para meu trabalho.

Agradeço ao meu amigo, professor Carlos Artur. Foi meu orientador de Graduação, Residência e co-orientador de Mestrado. Uma pessoa com o coração

enorme, que não mede esforços para ensinar e ver o melhor acontecer para com seus orientados.

Aos amigos Endrigo, Luis Eduardo e Clóvis. Irmãos de Graduação e companheiros de muitas situações e momentos alegres. Agradeço por caminharem comigo, sem medo dos nossos passos, permitindo que eu fizesse parte de suas vidas. Aos amigos Carlos e Eduardo. Amigos para qualquer hora, qualquer alegria ou frustração. Amigos para sempre.

Aos meus amigos de Lavras. Bruno, Anelise, Tatiana, Ana Julia, Gabriel, Imaculada, Érica, Januzia, Adriana, e todos que estiveram comigo.

Aos meus amigos Regis, Sâmia, Claudesson, Jackeline, Polyane, Reinaldo, Mauricio, Áurea, todas as crianças, Tuani, Vinicius, Mychele, Igor, Amanda, Sandra, Daniel, Kamila, Neide, Paula, Anahí, Vanessa, Luisa, Talita, Cleber... Todos que fizeram parte da minha caminhada dos últimos dois anos. Em especial à Comunidade Católica Gratidão pelos ensinamentos de vida.

Aos companheiros e amigos de república do Antro, Pedro, Luis, Zaine, Guido, Andre, Andre Escobar, Alexandre, Daniel, Roberto, Miguel, Márcio, Leonardo, Evandro, Diogo e todos que conviveram conosco em Jaboticabal. A nossa querida Cida, sempre presente em tantos caminhos.

Aos amigos e colegas de trabalho, Maria Emilia, Thatiana Carla, Isabel, Edson, Arnildo, Isilda, Rosane e todos os outros que fazem parte da minha vida.

Agradeço aos professores e profissionais que fizeram parte do desenvolvimento e confecção desse trabalho. Aos professores participantes da Banca de Qualificação, professores Marcos, Márcia, Maria Rita e Juliana e aos integrantes da Banca de Defesa do Doutorado, professores Marcos, Márcia, Carlos, Frederico e Wilter.

Agradecer à Universidade Estadual Paulista e a todos os responsáveis pelo Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” – FCAV/UNESP Jaboticabal. Também agradeço à todos os professores e funcionários da FCAV/UNESP.

Obrigado!

## SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS .....	I
LISTA DE FIGURAS .....	II
LISTA DE ABREVIATURAS .....	III
RESUMO .....	IV
ABSTRACT .....	V
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Neoplasia mamária em cadelas .....	3
2.2 Angiogênese e fator de crescimento endotelial (VEGF) .....	8
2.3 Ultrassonografia mamária .....	8
2.4 Modo Doppler .....	11
3. OBJETIVOS .....	14
3.1 Objetivo geral .....	14
3.2 Objetivos específicos .....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
4.1 Animais .....	15
4.2 Grupos experimentais .....	15
4.3 Histórico reprodutivo .....	16
4.4 Exame físico das neoplasias mamárias.....	16
4.5 Ultrassonografia convencional e modo Doppler .....	16
4.6 Diagnóstico histopatológico e imunoistoquímica para VEGF .....	17
4.7 Análise estatística .....	18

	Páginas
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
<b>5.1 Histórico reprodutivo .....</b>	<b>20</b>
<b>5.2 Exame físico das neoplasias mamárias .....</b>	<b>20</b>
<b>5.3 Diagnóstico histopatológico .....</b>	<b>21</b>
<b>5.3 Ultrassonografia convencional e modo Doppler em cores e <i>Power</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>5.4 Imunoistoquímica para VEGF .....</b>	<b>26</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>6.1. Histórico reprodutivo .....</b>	<b>27</b>
<b>6.2 Exame físico das neoplasias mamárias .....</b>	<b>27</b>
<b>6.3 Diagnóstico Histopatológico .....</b>	<b>28</b>
<b>6.4 Ultrassonografia convencional e modo Doppler em cores e <i>Power</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>6.5 Imunoistoquímica para VEGF .....</b>	<b>30</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>33</b>

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1.	Localização anatômica das neoplasias mamárias em cadelas, nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2010.....	21
Tabela 2	Freqüência de neoplasias mamárias em cadelas de com acordo o diagnóstico histopatológico nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2010.....	22
Tabela 3	Médias dos índices vasculares do modo Doppler em neoplasias mamárias de cadelas, de acordo grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2010.....	23

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fotomicrografias de neoplasias mamárias em cadelas no experimento, imunistoquímica para fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Note a classificação semiquantitativa: (A) escore 1 – coloração ausente; (B) escore 2 – coloração fraca; (C) escore 3 – coloração moderada; (D) escore 4 – coloração forte..... 18
- Figura 2: Imagem ultrassonográfica de neoplasia mamária em cadela. Notar em (A) regularidade e (B) irregularidade da superfície tumoral (setas). 24
- Figura 3: Imagem ultrassonográfica de neoplasia mamária em cadela. Notar em (A) homogeneidade (seta) e (B) heterogenicidade do parênquima tumoral (a: área hipoecogênica; b: área hiperecogênica)..... 24
- Figura 4: Imagem ultrassonográfica de neoplasia mamária em cadela. Notar em (A) presença de ponto ecogênico (seta) e área cística (a); em (B) presença de sombreamento acústico (C – marcação amarela)..... 25
- Figura 5: Em (A), imagem de modo Doppler em cores de neoplasia mamária em cadela. Notar (setas) presença de neovascularização tumoral; em (B), imagem de modo Doppler Power de neoplasia mamária em cadela. Note (seta) a forma de onda do fluxo sanguíneo para neovascularização tumoral..... 25
- Figura 6: Representação gráfica da regressão linear dos valores semiquantitativos de VEGF com a presença de vascularização (0: ausência; 1: presença) em neoplasias mamárias de cadela..... 26
- Figura 7: Representação gráfica da regressão linear dos valores semiquantitativos de VEGF com a velocidade máxima do fluxo sanguíneo de neoplasias mamárias em cadelas..... 26

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ab – mama abdominal

AgNORS - regiões organizadoras nucleolares argirofílicas

Cd – mama caudal

cm – centímetro(s)

cm/s – centímetro(s) por segundo

Cr – mama cranial

D – mama direita

E – mama esquerda

I – mama inguinal

IR – índice de resistência vascular

MHz - megahertz

mm – milímetro(s)

PCNA – antígeno nuclear de proliferação celular

PI – índice de pulsatividade

PVS – pico de velocidade sistólica

S/D – sístole por diástole

T – mama torácica

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

µm - micrômetros

## ULTRASSONOGRAFIA CONVENCIONAL E MODO DOPPLER EM CORES E POWER NA AVALIAÇÃO DA NEOPLASIA MAMÁRIA EM CADELAS

### RESUMO

O trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar a sensibilidade do exame ultrassonográfico convencional e modo Doppler no diagnóstico dos tumores mamários em cadelas, correlacionando esses achados com o diagnóstico histopatológico e imunoistoquímico. Estudou-se 60 tumores mamários de cadelas, divididos em dois grupos experimentais (1-benigno; 2-maligno). Pela ultrassonografia convencional, verificou-se ecogenicidade, regularidade e presença de outros achados (pontos ecogênicos, áreas císticas e sombreamento acústico). Pelo modo Doppler verificou-se vascularização, velocidades máxima e mínima, índice de resistência vascular (IR) e pulsatividade (PI). Após mastectomia, realizou-se diagnóstico histológico e imunoistoquímica, para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Diagnosticou-se 24 tumores benignos e 36 malignos. A ultrassonografia convencional não apresentou correlação entre regularidade, ecogenicidade e achados ultrassonográficos, com os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ). Ao modo Doppler em cores não houve significância entre presença de vascularização e sua característica entre grupos ( $p > 0,05$ ). Ao modo Doppler *Power* as médias diferiram para velocidade máxima 28,71cm/s em tumores malignos e 19,91cm/s em benigno ( $p = 0,0117$ ). Para velocidade mínima, IR e PI não houve diferença ( $p > 0,05$ ). Para VEGF, encontrou-se média de 2,22 para grupo 2 e 1,66 para grupo 1, com significância estatística ( $p = 0,0315$ ). Houve correlação positiva entre VEGF, presença de vascularização e velocidade máxima ( $p = 0,0469$ ). Conclui-se que o modo Doppler auxilia no diagnóstico de tumor mamário em cadelas de acordo com a malignidade.

**Palavras-chave:** ultrassonografia mamária, Doppler, VEGF, cadela

## **CONVENTIONAL ULTRASOUND AND COLOR-FLOW AND POWER DOPPLER FOR THE EVALUATION OF CANINE MAMMARY TUMORS**

### **ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the sensitivity of conventional and Doppler ultrasound for the diagnosis of mammary tumors in bitches and correlate the findings with histopathological and immunohistochemical diagnoses. Sixty mammary tumors were evaluated in bitches, which were divided into two experimental groups (1-benign; 2-malignant). The ultrasound evaluation allowed assessment of echogenicity, surface regularity and presence of other findings. Doppler evaluation allowed assessment of vascularization, maximum and minimum values of resistive index (RI) and pulsatility index (PI). After mastectomy, histological diagnosis and immunohistochemistry for evaluation of vascular endothelial growth factor were performed. Twenty-four benign and 36 malignant tumors were diagnosed. No correlations regarding surface regularity, echogenicity and ultrasound findings were found between the experimental groups by conventional ultrasound examination ( $p>0.05$ ). Likewise, no significant correlation was found between presence of vascularization and its characteristics between groups using color-flow Doppler ultrasound ( $p>0.05$ ). Power Doppler ultrasound yielded average maximum velocities of 28.71cm/s for malignant tumors and 19.91cm/s for benign tumors, which were significantly different ( $p=0.0117$ ). No significant differences were found for minimum velocity, RI and PI ( $p>0.05$ ). When analyzing vascular endothelial growth factor (VEGF), an average of 2.22 was found for group 2 and 1.66 for group 1; this difference was statistically significant ( $p=0.0315$ ). Positive correlation was found between presence of VEGF, presence of vascularization and maximum velocity ( $p=0.0469$ ). Therefore, Doppler evaluation can be used to assist in diagnosis malignancy of mammary tumors in bitches.

**Keywords:** mammary ultrasound, Doppler, bitches, VEGF

## 1. INTRODUÇÃO

A ultrassonografia em pequenos animais é um método de diagnóstico por imagem muito importante na rotina do médico veterinário. O conhecimento das características ultrassonográficas dos tecidos e sua anatomia podem auxiliar no diagnóstico de enfermidades (FELICIANO et al., 2008).

Em neoplasia mamária de cadelas, este exame ainda não tem sido usado com grande frequência, devido à falta de estudos que correlacionem os achados macroscópicos e microscópicos das neoplasias com as imagens ultrassonográficas. De forma geral, este método de diagnóstico é mais amplamente utilizado para a detecção de metástase em órgãos abdominais e linfonodos regionais (FELICIANO et al., 2008).

Entretanto, em medicina humana, a ultrassonografia já é usada na rotina e algumas técnicas são utilizadas para complementar o exame ultrassonográfico das mamas, como o modo Doppler em cores. Estas técnicas acabam sendo de grande valia no diagnóstico e acompanhamento na clínica oncológica humana (FELICIANO et al., 2008).

A neoplasia mamária em cadela apresenta uma significativa importância em medicina veterinária e tem sido muito investigada, principalmente por servir de modelo para o estudo do câncer de mama na mulher (MARTINS & FERREIRA, 2003). Os tumores mamários dos caninos apresentam várias características epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas semelhantes aos da espécie humana. Entre estas, podem ser citadas: faixa etária de aparecimento, morfologia, efeito protetor da ovariectomia, presença de receptores de estrógeno e progesterona, os órgãos alvo de metástase, a evolução clínica e a hereditariedade em alguns casos. Também foi demonstrado que neoplasias mamárias de cadelas apresentam fenótipo antigênico comparável àquele observado em lesões de mama em seres humanos com homologia entre ambos os genes (SILVA et al., 2004).

Sendo assim, as neoplasias mamárias dos canídeos são modelos apropriados e válidos no estudo da biologia do câncer nesta espécie e em seres humanos, assim como para testes de agentes terapêuticos, já que animais de companhia têm tumores que, do ponto de vista histopatológico e de comportamento biológico, são similares aos descritos na espécie humana (ZUCCARI et al., 2004).

Com o advento de técnicas em imagem, auxiliares em medicina veterinária, o exame ultrassonográfico das glândulas mamárias pode apresentar maior ganho em sua importância como método de diagnóstico (avaliação de sensibilidade na caracterização tumoral). O uso da ultrassonografia convencional e modo Doppler, correlacionado aos achados macroscópicos, ao diagnóstico histopatológico e imunoistoquímico (presença elevada dos fatores angiogênicos), pode ser de grande valia na abordagem diagnóstica e terapêutica das neoplasias mamárias em cadelas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Neoplasia mamária em cadelas

Os tumores mamários caninos constituem, aproximadamente, 52% de todas as neoplasias que afetam as fêmeas desta espécie, com cerca de 50% dos tumores mamários apresentando características de malignidade (QUEIROGA & LOPES, 2002).

Na gênese das neoplasias mamárias em cadelas estão envolvidos fatores de natureza genética, ambiental e hormonal. O papel dos hormônios sexuais na patogênese destas neoplasias está estabelecido, sendo que a castração, até o segundo cio, diminui a incidência dessas neoplasias (QUEIROGA & LOPES, 2002).

Recentemente, têm sido apontados alguns fatores nutricionais como promotores da carcinogênese. Esta correlação entre os fatores nutricionais e neoplasias mamárias está diretamente relacionada com a obesidade. QUEIROGA & LOPES (2002) mostraram que cadelas obesas entre os nove e 11 meses de idade, há maior risco de desenvolvimento de tumores de mama na idade adulta que em cadelas não obesas.

Segundo LANA et al. (2007), a probabilidade de desenvolvimento de tumores mamários aumenta com a idade do animal, situando-se a idade média de manifestação tumoral, nas cadelas, entre 10 e 11 anos.

Não existe predisposição racial evidente, embora as raças de caça sejam apontadas como tendo maior predisposição para esta enfermidade. Sabe-se apenas que os animais das raças Boxer e Beagle são referidos como aqueles que apresentam menor risco de desenvolverem tumores de mama (QUEIROGA & LOPES, 2002).

As neoplasias da glândula mamária da cadela surgem como nódulos associados ao mamilo ou, mais frequentemente, ao tecido glandular. Os canídeos possuem duas cadeias mamárias, esquerda e direita, cada uma delas com cinco glândulas: duas torácicas (torácica cranial – T1; torácica caudal – T2), duas abdominais (abdominal cranial – A1; abdominal caudal – A2) e uma inguinal (I1), podendo qualquer uma delas ser foco de um ou mais tumores. Sessenta e cinco a 75% das neoplasias ocorrem nas glândulas mamárias A2 e I1, provavelmente, por terem mais volume de tecido glandular que as demais (LANA et al., 2007)

A drenagem linfática dos tumores mamários caninos é complexa, tendo sido demonstrada a existência de comunicações linfáticas entre a cadeia mamária direita e a cadeia mamária esquerda e entre glândulas adjacentes de uma mesma cadeia; esta distribuição contribui para a ocorrência de metástases (FELICIANO et al., 2008).

Quanto à formação de metástases, as neoplasias mamárias podem ser classificadas como: regional (nos linfonodos regionais) ou à distância (ocorrendo por via linfática ou sanguínea). A metastização à distância pode ocorrer primeiramente no pulmão, posteriormente em linfonodos cervicais superficiais, esternais ou inguinais profundos e/ou em tecido hepático, renal e, menos freqüentemente, ósseo, cardíaco ou pele (LANA et al., 2007).

Cerca de 50% dos casos clínicos de neoplasias mamárias em cadelas aparecem em consulta apresentando lesões múltiplas, não apenas devido à rapidez de progressão do tumor, mas também devido ao adiamento na apresentação dos animais à avaliação clínica do médico veterinário (LANA et al., 2007).

A primeira abordagem de paciente com nódulos mamários deve consistir em exame físico minucioso, não apenas das glândulas mamárias, mas também de características gerais que permitam avaliar o estado geral do animal (LANA et al., 2007).

Ao exame físico da cadeia mamária, devem ser registrados os seguintes aspectos das lesões: consistência, número, localização e tamanho, assim como eventuais sinais de aderência aos tecidos adjacentes, deformações das mamas e ulceração em pele (LANA et al., 2007).

Via de regra, o tamanho das massas pode variar desde pequenos nódulos com 0,5 cm de diâmetro até tumores com mais de 15 cm no seu maior diâmetro. Em alguns animais, o tumor pode apresentar ulceração cutânea ou sinais evidentes de inflamação (FELICIANO et al., 2008).

Os linfonodos regionais (axilares e inguinais superficiais) devem sempre ser examinados quanto ao tamanho e consistência e, caso sejam considerados suspeitos, devem ser analisados, por punção aspirativa por agulha fina ou biopsia, para pesquisa de infiltração tumoral (LANA et al., 2007).

A realização de três projeções radiográficas do tórax (ventrodorsal e laterolaterais esquerda e direita) é essencial para avaliar a presença de metástases pulmonares e pleurais.

Ao exame radiográfico, as áreas de metástase pulmonar surgem como áreas de densidade intersticial (LANA et al., 2007).

O diagnóstico diferencial é possível por meio da avaliação microscópica, por citologia ou histopatologia (MISDROP et al., 1999). Segundo estes autores, os diagnósticos diferenciais que devem ser considerados na apresentação clínica de nódulos mamários são: 1) tumores mamários malignos; 2) tumores mamários benignos; 3) tumores cutâneos e subcutâneos; 4) mastites; e 5) hiperplasias/displasias mamárias.

Histologicamente, os tumores mamários são interpretados como benignos ou malignos. Com base no histórico do animal e no seu exame físico, o tumor maligno caracteriza-se por apresentar um crescimento rápido, infiltração nos tecidos vizinhos e freqüente ulceração. O tumor benigno possui crescimento lento e expansivo, tendo área circunscrita, não aderindo aos tecidos adjacentes; suas células são bem diferenciadas, próximas do tecido normal e as atipias celulares são raras e discretas (CARVALHO, 2006).

De acordo com MISDROP et al. (1999), os tumores mamários podem ser divididos em simples e complexos. Os tumores simples são aqueles compostos por células epiteliais ou mioepiteliais, ou seja, somente um tipo celular; já os complexos são aqueles formados por células epiteliais e mioepiteliais, ou seja, ambas. Os tumores mamários podem, ainda, ser classificados como mistos (termo usado quando há metaplasia).

Os tumores benignos podem ser classificados em adenoma simples, adenoma complexo, adenoma basalóide, fibroadenoma de baixa celularidade, fibroadenoma de alta celularidade, tumor misto benigno e papiloma ductal. Os tumores benignos constituem cerca de 50% das neoplasias mamárias caninas, dentre os quais adenomas complexos, fibroadenomas e tumores mistos benignos constituem os grupos mais representativos. Adenomas simples, adenomas basalóides e papilomas ductais são neoplasias benignas raras desta espécie animal (MISDROP et al., 1999).

Os tumores mistos benignos são relativamente comuns e constituídos de tecido epitelial, mioepitelial e mesenquimatoso, sendo este último constituído por um ou mais dos seguintes elementos: cartilagem, osso e/ou gordura; tendo todos eles origem provável em células estaminais pluripotentes (LANA et al., 2007).

As neoplasias mamárias malignas podem ser classificadas em carcinoma não infiltrativo (*in situ*), carcinoma complexo, carcinoma túbulo papilífero simples, carcinoma

sólido simples, carcinoma anaplásico simples, carcinoma de célula escamosa, carcinoma mucoso, carcinoma lipídico, fibrossarcoma, osteosarcoma, carcinosarcomas e carcinoma ou sarcoma em tumor benigno (MISDROP et al., 1999).

Os tumores mamários mais comuns das cadelas são os carcinomas (tumores de origem epitelial), mais especificamente os carcinomas simples (MISDROP et al., 1999; LANA et al., 2007). Os carcinomas simples dividem-se em três tipos, que, por ordem crescente de malignidade, são: túbulo papilíferos, sólidos e anaplásicos. Os carcinomas complexos distinguem-se dos simples por possuírem tanto componente epitelial quanto mioepitelial (MISDROP et al., 1999).

Carcinomas de tipo especial são muito menos frequentes que os simples. Os sarcomas mamários representam proporção baixa dos casos (10% a 15%) e têm origem celular ainda não totalmente esclarecida. Há duas hipóteses para a sua gênese: desenvolvimento neoplásico a partir de tecido mioepitelial ou desenvolvimento a partir de tecido de conexão intralobular (RUTTEMAN & KIRPENSTEIJN, 2003; LANA et al., 2007). Fibrossarcomas e osteossarcomas são as neoplasias mamárias mais comuns dentro deste grupo. Outros sarcomas que podem ser diagnosticados raramente na espécie canina são condrossarcomas e lipossarcomas (MISDROP et al., 1999).

Os carcinossarcomas são tumores malignos extremamente raros que possuem na sua constituição componentes epiteliais (carcinomatosos) e de tecido de conexão (sarcomatosos), apresentando-se, na maioria dos casos, como lesões bem circunscritas e com períodos de sobrevivência pós-cirurgia prolongados (em média 18 meses) (MISDROP et al., 1999; LANA et al., 2007).

A presença de carcinomas ou de sarcomas em tumores benignos é encontrada ocasionalmente nas cadelas, sendo difícil determinar se o componente maligno se desenvolveu no seio do benigno ou se o invadiu. A informação prognóstica disponível para este tipo de tumor é escassa (MISDROP et al., 1999).

Embora seja impossível estabelecer um diagnóstico de malignidade exclusivamente com base no aspecto macroscópico da neoplasia, existem algumas características que podem ser usadas como indicadores de um comportamento maligno: 1) o crescimento rápido; 2) as margens mal definidas; 3) aderência à pele e aos tecidos adjacentes; 4) presença de ulceração e inflamação intensa; 5) linfadenomegalia regional; e 6) sinais de

dificuldade respiratória (dispnéia). A presença de um ou mais destes sinais, em conjunto com a própria massa, são indicativos de maior probabilidade de malignidade das neoplasias (LANA et al., 2007).

MISDROP et al. (1999) comentam a presença das seguintes características microscópicas para caracterização histopatológica da malignidade em neoplasia mamária: 1) crescimento infiltrativo e/ou destrutivo para os tecidos adjacentes; 2) invasão dos vasos sanguíneos e linfáticos; 3) marcação imunoistoquímica do fator de Von Willebrand; 4) descontinuidade ou ausência das membranas basais; 5) focos de necrose; 6) elevados índices de figuras mitóticas; 7) elevadas quantidades de marcadores de proliferação *AgNORs* (Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofílicas) e *PCNA* (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular); 8) grande proporção de aneuploidia do DNA; 9) presença de anaplasia e pleomorfismo celular e nuclear. Para RUTTEMAN & KIRPENSTEIJN (2003), a ausência de sinais para malignidade não garante a benignidade da lesão.

## **2.2 Angiogênese e fator de crescimento endotelial**

A observação de que o crescimento tumoral é acompanhado pela proliferação vascular foi feita há mais de 100 anos, sendo criada pelos autores a hipótese de que a neovascularização facilitaria o crescimento tumoral, por meio do suprimento de nutrientes e oxigênio, além de remover catabólitos celulares. MARGI & NEWLAND (2000) comentam que em 1945, ALGIRE & CHALKLEY iniciaram a quantificação de vasos associados ao crescimento tumoral, verificando que a fase de crescimento acelerado do tumor é precedida por um aumento local na densidade de vasos.

A angiogênese é um processo múltiplo e complexo, caracterizado pela formação de novos capilares (neovascularização) a partir da rede vascular preexistente, essencial para o crescimento do tumor e metástases (RESTUCCI et al., 2000).

As células endoteliais proliferam 30 a 40 vezes mais rápido em neoplasias que na vascularização de tecidos normais. Em medicina humana, encontrou-se uma correlação significativa entre a angiogênese acentuada (evidenciado por uma alta densidade de microvasos), metástases e prognóstico de tumores, incluindo câncer de mama (RESTUCCI et al., 2000).

Os tumores malignos têm, caracteristicamente, a capacidade de induzir uma neoformação vascular e, ao mesmo tempo em que estes tumores aumentam em tamanho, estimular esta neovascularização pela secreção de fatores angiogênicos (LUCENA, 2006).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma proteína dimérica que estimula a migração e proliferação de células endoteliais vasculares. O VEGF é produzido por células neoplásicas, plasmáticas, macrófagos e, às vezes, também por linfócitos, exercendo efeitos parácrinos (liga-se a receptores específicos de tirosinase localizados nas células endoteliais vasculares) e efeitos autócrinos (quando estimulados por células neoplásicas) (RESTUCCI et al., 2002).

Entre as múltiplas ações nas células endoteliais, o VEGF age como um mitógeno específico em veias, artérias e vasos linfáticos, além de se constituir em um fator inibidor de apoptose (por meio de estimulação da produção da proteína antiapoptótica Bcl-2, nestas células). Também pode afetar a permeabilidade do endotélio, porém para sua ação angiogênica atuar, não é necessário que ocorra a ação de aumento de permeabilidade endotelial (PLATE, 2001).

A proliferação celular induzida por VEGF promove metástase: 1) induzindo a formação da neovascularização; 2) produção de colagenase e outras enzimas de degradação que facilitam a proliferação de células neoplásicas; e 3) estimulação das células neoplásicas (mitose) (RESTUCCI et al., 2002).

No trabalho de GRAHAM & MYERS (1999) foi demonstrado que a angiogênese pode ser um indicador independente e significativo do prognóstico nas neoplasias malignas de mama em cadelas, assim como é na mulher.

O fator de crescimento endotelial vascular é mais comumente estudado em oncologia humana. Em medicina veterinária são poucos os estudos relatados (RESTUCCI et al., 2002).

### **2.3 Ultrassonografia mamária**

Para NYMAN et al. (2006b), a ultrassonografia mamária em cadelas pode ser uma técnica de imagem importante para distinguir os tipos específicos de tumor, favorecendo o tratamento e prognóstico para cada paciente.

A utilização das técnicas de citologia não é considerada adequada para classificação dos tumores mamários em cadelas, além de ser um método invasivo. De acordo com NYMAN et al. (2006b), é relevante o estudo de técnicas de imagem, como a ultrassonografia, método não invasivo para avaliação destes tumores.

Em neoplasias mamárias de cadelas, os achados ultrassonográficos podem se relacionar com a composição tecidual da massa. As características estudadas são a ecogenicidade, ecotextura, limites, compressibilidade, tamanho, arquitetura do parênquima e alterações em tecidos vizinhos (NYMAN et al., 2006a).

BASTAN et al. (2009) relataram que a ultrassonografia foi útil para a avaliação do tamanho, forma, irregularidade da superfície, ecogenicidade e transmissão acústica de tumor mamário em cadela. Por meio desse estudo, os autores verificaram que o exame apresenta pouca sensibilidade na avaliação da malignidade das neoplasias mamárias nesta espécie.

São poucos os estudos, em veterinária, que avaliam a sensibilidade do exame ultrassonográfico de neoplasias mamárias. De acordo com NYMAN et al. (2006b) são necessárias novas pesquisas para determinar a eficácia dessa técnica de imagem na diferenciação tumoral de mamas em cadelas.

Atualmente em rotina, esta técnica de imagem em veterinária limita-se à avaliação de áreas de metástase em abdômen e o acometimento de linfonodos, como o axilar e o inguinal superficial (ZUKI & BOYD, 2004).

Em medicina humana, PAULINELLI et al. (2002) e LUCENA (2006) postularam que a heterogeneidade dos tecidos tumorais, contornos de superfície irregulares, presença de bordas pouco nítidas, atenuação acústica posterior, espessamento ou retração da pele (hiperecogenicidade), espiculações e visibilidade de calcificações devem ser considerados como critérios sugestivos de malignidade.

BARRA et al. (2004) citam que a ultrassonografia da mama em mulheres é útil na diferenciação de lesões císticas e sólidas, mas não pode ser utilizada como teste diagnóstico definitivo na abordagem de lesões sólidas, devido à sobreposição significativa nas características de tumores benignos e malignos.

De acordo com BULNES et al. (1998) e CALAS et al. (2007) os tecidos com margens regulares representam o principal critério para definição de uma lesão como benigna. As características de malignidade descritas são margens irregulares e sombreamento acústico.

Esses autores relatam que tumores malignos, geralmente, apresentam ecogenicidade heterogênea, enquanto nos benignos o padrão ecogênico é homogêneo.

Em mulheres, a ultrassonografia permite acesso ao tumor em seu eixo maior, além da medida direta sem ampliação da lesão, fornecendo informações sobre infiltração ductal, caracterizada por dilatação assimétrica do ducto, distorção ductal, conteúdo sólido fixo e/ou vegetante endoductal e alterações de parede do ducto. Além disso, alguns tumores não palpáveis ao exame físico podem ser detectados (SIQUEIRA, 2006; CALAS et al., 2007).

Em medicina humana, a ultrassonografia pode ser utilizada para avaliação da mama operada, com o objetivo de individualizar recidivas eventuais e/ou complicações secundárias ao tratamento cirúrgico, como hematomas e seromas. Outra função citada é servir como guia de métodos de diagnósticos, como a punção aspirativa por agulha fina (SIQUEIRA, 2006).

De forma geral, a qualidade do procedimento é dependente do conhecimento do operador. Trata-se de uma técnica de imagem de simples execução, rápida realização, não invasiva, segura e de baixo custo (CALAS et al., 2007).

Em medicina humana, o transdutor utilizado para a ultrassonografia mamária é de alta resolução (7,5 a 13,0MHz) favorecendo uma boa interface material/mama, mas limitando o campo de exploração a uma pequena parte do volume mamário (SIQUEIRA, 2006; TRASCH et al., 2007). Em rotina veterinária, os transdutores utilizados apresentam frequência entre 5,0 a 7,5MHz (convencional). Em estudo realizado por NYMAN et al. (2006b) foram utilizados transdutores de alta resolução (7,0 a 14,0MHz), favorecendo a visibilização de estruturas menores.

Apesar de ainda existirem controvérsias, a maioria dos autores concorda que, com os equipamentos atuais, lesões mamárias sólidas, em mulheres, com mais de 5mm podem ser adequadamente avaliadas por meio da ultrassonografia (PAULINELLI et al., 2002).

Sua maior limitação é inabilidade de detecção de microcalcificações e lesões menores que 5mm de diâmetro, podendo ocorrer resultados negativos falsos (SIQUEIRA, 2006; CALAS et al., 2007; TRASCH et al., 2007).

## 2.4 Modo Doppler

A ultrassonografia Doppler ou modo Doppler é um método relativamente recente em medicina veterinária. A ferramenta Doppler associada à ultrassonografia convencional fornece informações em tempo real sobre a arquitetura vascular e os aspectos hemodinâmicos dos vasos em diversos órgãos (CARVALHO et al., 2008).

Em 1842, Christian Johann Doppler descreveu a situação na qual uma fonte de ondas (sonoras ou eletromagnéticas), que está em movimento em relação a um receptor, altera a frequência de onda durante este processo, aumentando a frequência durante a aproximação da fonte e diminuindo durante o seu distanciamento (CARVALHO et al., 2008).

Assim, em ultrassonografia, o chamado efeito Doppler pode ser definido como sendo o princípio físico no qual se verifica a alteração da frequência das ondas sonoras refletidas quando o objeto (corpo) refletor se move em relação a uma fonte de onda sonora. Supondo que o transdutor do equipamento capte o movimento de um objeto analisado, deve-se esperar um deslocamento da frequência incidente sobre o objeto, promovendo aumento da resposta quando ambos se aproximam e redução quando se afastam. No âmbito médico e veterinário, este efeito é usado durante o exame dos vasos sanguíneos. As hemácias em movimento dentro dos vasos, ao encontrarem uma onda sonora, comportam-se como corpos refletores. O estudo por meio do efeito Doppler registra o movimento do sangue no sistema cardiovascular (FEIGENBAUM, 1986; VERMILLON, 1997).

A perfusão de cada órgão determina o estado do seu leito vascular, que, por sua vez, afeta as características de fluxo dos vasos adjacentes (FINNBODNER & HUDSON, 1998).

O contorno da linha de frequência de deslocamento Doppler máxima corresponde ao tempo de variação da máxima velocidade de fluxo dentro do vaso. Cada contração cardíaca causa um impulso no fluxo sanguíneo e resulta na distensão das artérias. O fluxo diastólico reverso ocorre porque o sangue é rebombeado da aorta com velocidade refletida de alta impedância do leito vascular periférico dos membros posteriores (CARVALHO et al., 2008).

À medida que o diâmetro vascular retorna ao normal, a energia repercutida fornece o potencial necessário para promover fluxo contínuo durante a diástole. O fluxo sanguíneo das artérias supre os órgãos parenquimatosos (ex.: rins, fígado e baço), que requerem perfusão constante. Normalmente, esses órgãos apresentam fluxo contínuo, gradualmente

decrecente no período diastólico e sem fluxo diastólico reverso (SZATMARI et al., 2001; NYLAND & MATTOON , 2002).

A largura do traçado indica a variação das velocidades presentes dentro do volume de amostra. A escala de cinza em qualquer porção do traçado representa o número relativo de células sanguíneas que viajam a uma velocidade particular, de forma que as áreas mais brancas representam o maior número de células sanguíneas (CARVALHO et al., 2008).

A média de velocidade ou de deslocamento de frequência é calculada automaticamente na maioria dos aparelhos de ultrassom com modo Doppler *Power*. Os índices hemodinâmicos, como a relação sístole/diástole (S/D), o índice de resistência vascular (IR), o pico de velocidade sistólica (PVS) e o índice de pulsatividade, permitem a comparação do fluxo durante a sístole e na diástole. Esses índices são utilizados para auxiliar na avaliação de estenose, trombose, ou, mais comumente, nos vasos periféricos com fluxo de resistência aumentada (CARVALHO et al., 2008).

Em neoplasias, de acordo com MARTINS et al. (2002), o desenvolvimento de vasos alterados em carcinomas, devido à resposta a fatores angiogênicos, pode levar à diminuição da resistência do fluxo sanguíneo intratumoral. Esta característica dos tumores permitiu levantar a hipótese de que o Doppler seria capaz de distinguir lesões malignas de benignas. Esses consideram que a Dopplervelocimetria colorida (modo Doppler com cores) associada à ultrassonografia convencional, em medicina humana, tem mostrado alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico dos tumores mamários.

A sensibilidade do método em diferenciar tumores benignos de malignos varia entre 91% a 95%, com especificidade de 89% a 97% e acurácia de 90%. Para essa avaliação, TRASCH et al. (2007) relacionam tumor de mama aos princípios do modo Doppler em cores, como o aumento da vascularização e a presença de neovascularização nas neoplasias.

Como comentado por NYMAN et al. (2006b), as lesões malignas costumam apresentar maior vascularização que as benignas e, às vezes, é possível observar neovascularização no interior dos tumores malignos, por meio do modo Doppler em cores. Adicionalmente, a vascularização está relacionada com a invasividade.

MEIS & LEVY (2007), estudando a quantificação de vasos associados ao crescimento tumoral, verificaram que a fase de crescimento acelerado do tumor é precedida por um aumento local da densidade de vasos.

A mudança na característica da vascularização detectada pelo exame Doppler pode ser também um indicador de regressão do tumor, oferecendo informações adicionais no estudo da evolução dos tumores mamários (MARTINS et al., 2002).

Segundo MARTINS et al. (2002), o modo Doppler em cores, associado à ultrassonografia convencional, é capaz de avaliar a vascularização tumoral por meio de diversos parâmetros: mensuração da velocidade máxima do fluxo na sístole e sua média, velocidade sistólica mínima, quantificação do número de vasos, soma das velocidades máximas dos vasos e sua média, relação entre sístole e diástole máxima e mínima e sua média, médias das velocidades e determinação dos índices de resistência e de pulsatividade e de suas médias.

Em medicina humana, DOCK et al. (1991) demonstraram com o auxílio do modo Doppler *Power*, que picos de velocidade sistólica maiores que 20cm/s são característicos de malignidade. LUCENA (2006) verificou que a presença de fluxo turbulento, sinais pulsáveis de alta impedância (penetração), elevada velocidade máxima e fluxo venoso foram sugestivos de lesões malignas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar a sensibilidade do exame ultrassonográfico convencional e modo Doppler em cores no diagnóstico dos tumores de mama em cadelas.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Diagnosticar áreas de neovascularização com o modo Doppler em cores, mensurando os índices vasculares do tecido avaliado por meio do Doppler *Power*.
- Semiquantificar os valores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) de neoplasias mamárias em cadelas.
- Correlacionar os achados macroscópicos, à inspeção física, o diagnóstico histopatológico e imunoistoquímico aos resultados obtidos pela ultrassonografia convencional e modo Doppler em cores e *Power*, visando dar respaldo à técnica de imagem.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizadas neste experimento, 60 cadelas, de diferentes idades e raças, pacientes do Hospital Veterinário do Setor de Clínica Cirúrgica da Universidade de Brasília. Todo procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, processo no 018568-08, UNESP/Jaboticabal.

### 4.2 Grupo Experimental

Os animais foram submetidos ao exame clínico, radiográfico do tórax e hemograma. Esses resultados foram importantes para determinar a história reprodutiva do animal, a evolução da massa mamária, avaliação do estado de saúde do paciente e para a caracterização da afecção mamária, visando o encaminhamento à mastectomia.

Foram utilizadas neste experimento 60 neoplasias mamárias de cadelas. Após a realização do estudo ultrassonográfico das neoplasias mamárias, os animais foram divididos em dois grupos experimentais de acordo com as características histopatológicas, segundo MISDROP et al. (1999):

**GRUPO 1:** neoplasia mamária com características benignas (n=24);

**GRUPO 2:** neoplasia mamária com características malignas (n=36);

A realização da radiografia torácica foi indicada para diagnóstico de metástase pulmonar e avaliação cardíaca, antes do procedimento cirúrgico.

Todos os dados adquiridos, por meio dessa avaliação prévia, foram arquivados com a identificação do animal.

### **4.3 Histórico reprodutivo**

O histórico reprodutivo dos animais foi abordado durante a realização da anamnese. Foram questionadas informações referentes à esterilidade dos animais (castrados ou não), administração de contraceptivos pelos proprietários e quanto a regularidade do cio das cadelas.

### **4.4 Exame físico das neoplasias mamárias**

Ao exame físico das neoplasias mamárias foram determinadas as características macroscópicas de acordo com a evolução tumoral (lento ou rápido), regularidade da superfície (regular ou irregular), consistência da massa (firme ou flutuante), tamanho (centímetros) e localização anatômica tumoral. O tamanho das massas foi obtido com auxílio de paquímetro, sendo realizada a medida de comprimento das neoplasias.

### **4.5 Ultrassonografia e modo Doppler**

Para realização de cada exame ultrassonográfico, as fêmeas foram tricotomizadas amplamente no abdômen, entre a região epigástrica e hipogástrica.

Após a tricotomia, os animais foram encaminhados para a sala de ultrassonografia. Por meio da contenção dos membros, as cadelas foram colocadas em decúbito dorsal, com a cabeça na direção do monitor e o corpo paralelo ao aparelho. Antes do exame, aplicou-se gel específico para a realização de ultrassonografia.

Para a realização do exame ultrassonográfico e para facilitar a visualização das imagens, os animais foram submetidos a jejum alimentar de seis horas.

A ultrassonografia foi realizada com transdutor convexo de 5,0MHz e linear de 12,0MHz, utilizando aparelho MyLab VET 30<sup>1</sup>.

Por meio deste exame, avaliaram-se as características ecogênicas das massas mamárias: ecogenicidade do parênquima, regularidade da superfície e presença de achados

---

<sup>1</sup> Aparelho ultrassonográfico ESAOTE – Mylab VET30.

ultrassonográficos. Também foi avaliada a presença de metástase em órgãos abdominais e linfonodos regionais.

Por meio do modo Doppler em cores foi visibilizada a presença e o tipo de vascularização (laminar ou turbulenta) dos tumores mamários. Com o uso do Doppler *Power*, foram estudadas a velocidade máxima (pico de velocidade sistólica), mínima, índice de resistência e pulsatividade dos vasos.

#### **4.6 Diagnóstico histopatológico e imunoistoquímica para VEGF**

Os fragmentos dos tumores mamários foram colhidos e encaminhados para processamento, após mastectomia, ao Setor de Patologia do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, para diagnóstico histopatológico considerando as dimensões do tumor e sua relação com o tecido adjacente.

aspecto macroscópico de cada neoplasia foi avaliado e os fragmentos colhidos fixados em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos (pH 7,4) e processados rotineiramente até a inclusão em parafina. Cortes de 5µm foram feitos em micrótomo e posteriormente corados por hematoxilina e eosina. Em análise da microscopia de luz, efetuou-se classificação da neoplasia, segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde (MISDROP et al., 1999).

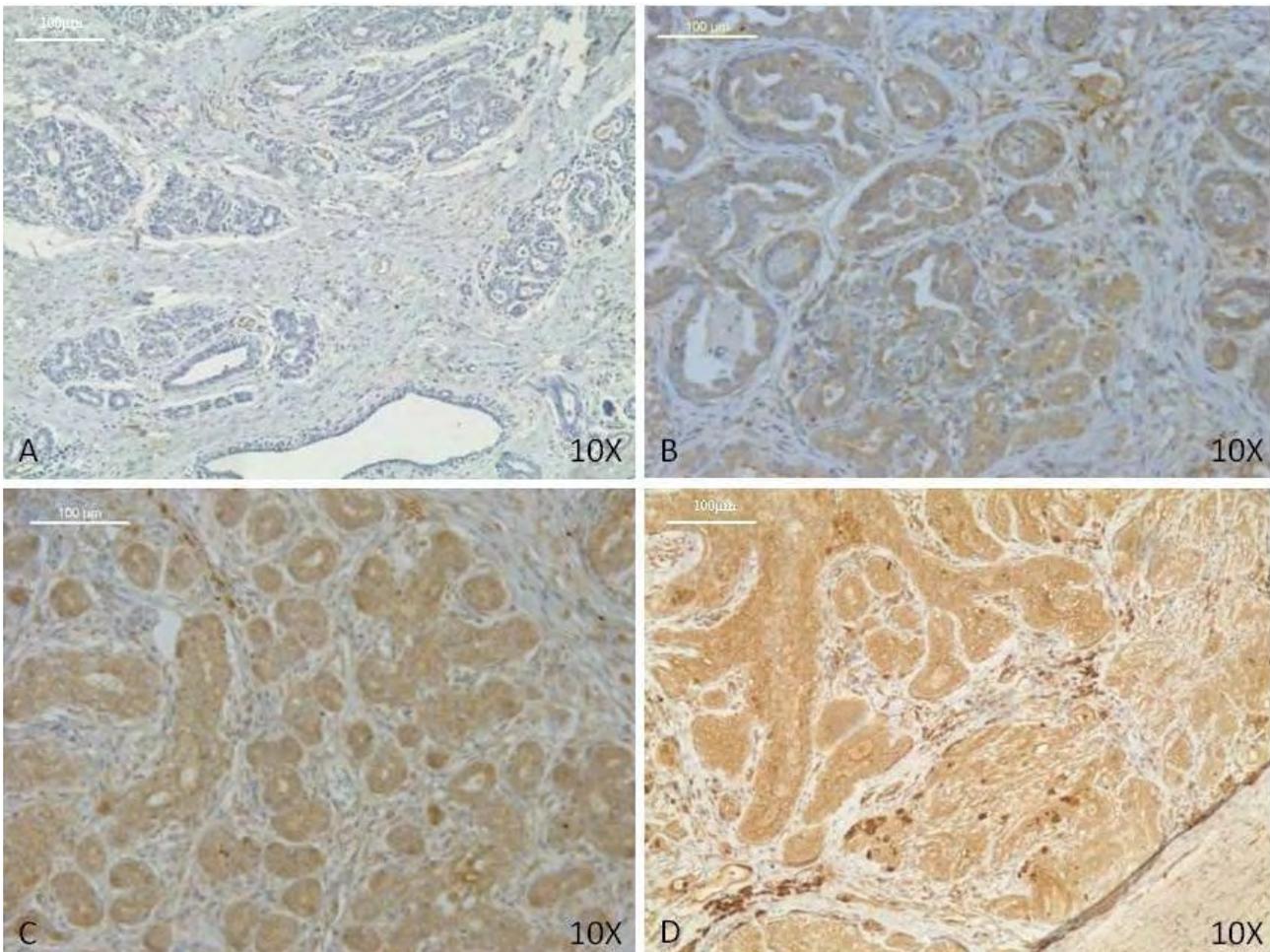
A técnica de imunoistoquímica, utilizando kit polimerase<sup>2</sup> e anticorpo para VEGF<sup>3</sup>, foi aplicada para avaliar a expressão dos antígenos tumorais (TURLEY et al., 1998; REBÊLO, 2009).

A imunorreação foi analisada de forma semiquantitativa, de acordo com a intensidade da coloração acastanhada no citoplasma das células neoplásicas, usando os seguintes escores: 1=ausência de coloração; 2=coloração fraca; 3=coloração média e 4=coloração forte (TURLEY et al., 1998) (Figura 2). Os valores de VEGF foram correlacionados com variáveis do modo Doppler (vascularização).

---

<sup>2</sup> Kit polymerase NovoLink - TM Polymer detection system.

<sup>3</sup> Anticorpo Abcam - Mouse monoclonal VG-1-VEGF.



**Figura 1:** Fotomicrografias de neoplasias mamárias em cadelas no experimento, imunoistoquímica para fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Note a classificação semiquantitativa: (A) escore 1 - coloração ausente; (B) escore 2 – coloração fraca; (C) escore 3 – coloração moderada; (D) escore 4 – coloração forte.

#### 4.7 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados foram previamente testados para normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias (teste F). Foram utilizados o PROC MEANS-SAS® e GraphPad Prisma 4.

As médias reais ou transformadas foram avaliadas pela análise de variância e, com significância foi realizado o desdobramento do estudo estatístico de médias pelo teste pareado de médias (teste t). As médias não homogêneas em teste de normalidade foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney. Foi utilizado nível de significância de 5%, para todos os testes realizados.

As porcentagens e frequências foram avaliadas por meio dos testes Qui-quadrado e exato de Fischer. A correlação de dados experimentais foi realizada por meio de regressão linear. Foi utilizado nível de significância de 5%, para todos os testes realizados.

## **5. RESULTADOS**

Os animais do experimento não apresentaram alterações hematológicas e radiográficas (áreas de metástase pulmonar) que pudessem impedir a realização dos procedimentos de colheita das neoplasias por meio da mastectomia. É importante citar a ausência de pacientes com alterações radiográficas e ultrassonográficas sugestivas de áreas de metástase a também alterações hematológicas que colocariam em risco a vida dos animais durante o procedimento cirúrgico.

### **5.1 Histórico reprodutivo**

Por meio da anamnese obtiveram-se dados relevantes sobre regularidade do cio, administração de anticoncepcionais e castração. Cerca de 10% das cadelas apresentavam regularidade do cio, enquanto 90% tinham irregularidade. Ao questionar os proprietários quanto à utilização de substâncias contraceptivas, 13,37% dos animais receberam a medicação e 86,63% das cadelas não foram medicadas. Em relação ao procedimento de castração, 83,33% das cadelas no experimento não eram castradas e 16,67% eram ovariectomizadas.

### **5.2 Exame físico das neoplasias mamárias**

Ao exame específico, em 24 neoplasias do grupo 1 e 33 do grupo 2 verificou-se consistência firme, sendo que apenas três neoplasias malignas apresentaram consistência flutuante. Para a consistência tumoral, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p=0,2678$ ).

Para a característica de regularidade da superfície tumoral, não se observou diferença entre os grupos experimentais ( $p=0.1006$ ). Encontrou-se presença de regularidade na superfície de 22 neoplasias benignas e 27 malignas. Duas amostras do grupo 1 e nove do grupo 2 apresentaram superfície irregular.

Ao avaliar o tamanho das neoplasias mamárias, entre os grupos experimentais, verificou-se diferença ( $p=0,0077$ ). As massas do grupo 1 apresentaram um tamanho médio de  $0,78\pm 1,13\text{cm}$  e as do grupo 2 de  $1,81\pm 2,29\text{cm}$ .

Não houve diferença entre os grupos experimentais em relação à localização anatômica das neoplasias mamárias ( $p=0,1404$ ), como demonstrada na tabela 1:

**Tabela 1:** Localização anatômica das neoplasias mamárias em cadelas, nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2010.

<b>Antímero Esquerdo</b>	<b>I1</b>	<b>A2</b>	<b>A1</b>	<b>T2</b>	<b>T1</b>
<b>Grupo 1</b>	5	2	3	1	1
<b>Grupo 2</b>	9	4	11	0	0
<b>Total</b>	14	6	14	1	1
<b>Antímero Direito</b>	<b>I1</b>	<b>A2</b>	<b>A1</b>	<b>T2</b>	<b>T1</b>
<b>Grupo 1</b>	2	5	2	1	2
<b>Grupo 2</b>	4	1	4	3	0
<b>Total</b>	6	6	6	4	2

I1: mama inguinal; A2: mama abdominal caudal; A1: mama abdominal cranial; T2: mama torácica caudal; T1: mama torácica cranial.

Tabela de contingência, para teste de Qui-quadrado em nível de significância de 5%.

### 5.3 Diagnóstico histopatológico

Após a realização da mastectomia e análise histopatológica, diagnosticou-se 24 massas apresentando características benignas (40%) e 36 tumores malignos (60%). Entre as neoplasias mamárias benignas encontraram-se adenomas mamários (4), fibroadenomas (5), tumores benignos mistos (11), tecidos mamários hiperplásicos (2) e tecidos mamários saudáveis (2). Entre os tumorais malignos observou-se carcinomas simples tubulares (9), carcinomas complexos tubulares (13), túbulo papilíferos (4), tumor de células fusiformes (1), carcinoma simples sólidos (6) e complexos sólidos (3).

A distribuição das freqüências de neoplasias mamárias em cadelas, de acordo com os grupos experimentais está demonstrada na tabela 2:

**Tabela 2:** Frequência de neoplasias mamárias em cadelas de com acordo o diagnóstico histopatológico nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2010.

<b>Classificação</b>	<b>Frequência</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
<u>Grupo 1 (benigno):</u>	24	40
- Adenoma mamário	4	6,67
- Fibroadenoma	5	8,33
- Hiperplasia mamária	2	3,33
- Tecido mamário	2	3,33
- Tumor benigno misto	11	18,33
<u>Grupo 2 (maligno):</u>	36	60
- Carcinoma simples tubular	9	15,00
- Carcinoma complexo tubular	13	21,67
- Carcinoma complexo túbulo papilífero	4	6,67
- Carcinoma células fusiformes	1	1,67
- Carcinoma simples sólido	6	10,00
- Carcinoma complexo sólido	3	5,00
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>100</b>

#### 5.4 Ultrassonografia e modo Doppler em cores e *Power*

Por meio do exame ultrassonográfico, 22 tumores mamários benignos apresentaram superfície regular e duas massas com irregularidade de superfície. Para tumores malignos foram visibilizados 27 tumores mamários com regularidade e nove com irregularidade de superfície (Figura 2). Ao comparar a regularidade da superfície tumoral entre os grupos experimentais não houve diferença ( $p=0,1758$ ).

Para ecogenicidade do parênquima tumoral, visibilizou-se que 18 nódulos benignos e 16 malignos apresentaram ecogenicidade homogênea, enquanto seis tumores benignos e 20 malignos apresentaram ecogenicidade heterogênea (Figura 3). Não houve diferença entre os grupos 1 e 2 ( $p=0,2883$ ).

Em tumores mamários com ecogenicidade heterogênea, foram visibilizados a presença de área cística (um tumor maligno), pontos ecogênicos (seis neoplasias benignas e

10 malignas), áreas císticas com pontos ecogênicos (dois tumores benignos e sete malignos) e sombreamento acústico (uma neoplasia maligna) (figura 4). Não houve diferença para esta variável ( $p=0,5131$ ).

Ao estudar a vascularização por meio do Doppler em cores, 13 neoplasias benignas e 16 malignas não apresentaram vascularização visível. A visualização de vascularização ocorreu em 11 tumores benignos e 20 tumores malignos (Figura 5). Não houve diferença entre os grupos experimentais ( $p=0,5989$ ). Para o tipo de vascularização (laminar e turbulenta) por meio do Doppler em cores não verificou-se diferença significativa ( $p=0,7055$ ).

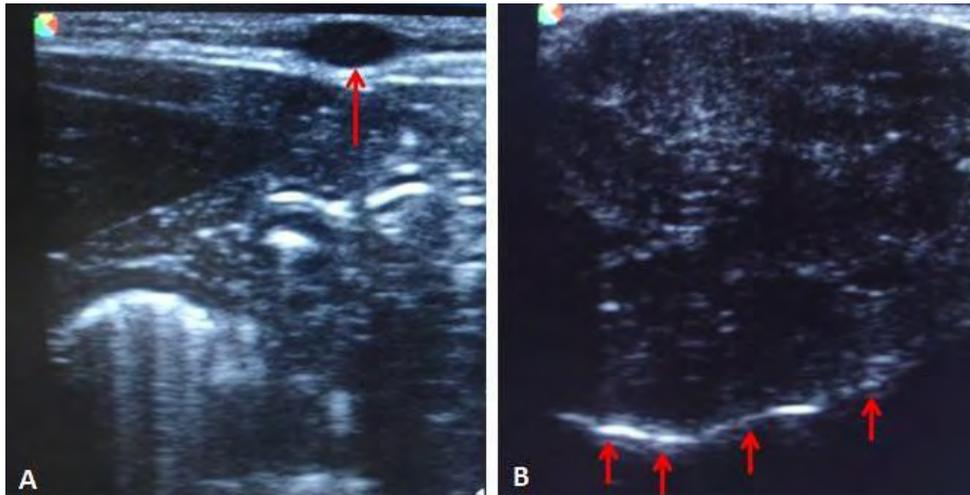
Por meio do Doppler *Power*, as médias diferiram para velocidade máxima, sendo de 28,71cm/s para tumores malignos e 19,91cm/s para benignos ( $p=0,0117$ ). Para velocidade mínima, não foi verificada diferença ( $p=0,1172$ ) entre as médias, sendo 10,69 cm/s para tumores malignos e 7,17cm/s em tumores benignos. Também, não houve diferença entre os grupos experimentais para o índice de resistência vascular (IR) ( $p=0,8781$ ) e pulsatividade (PI) ( $p= 0,8422$ ), com médias para os tumores mamários malignos de 0,71 (IR) e 1,81 (PI) e para benignos de 0,66 (IR) e 1,45 (PI) (Figura 5) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Médias dos índices vasculares do modo Doppler em neoplasias mamárias de cadelas, de acordo grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2010.

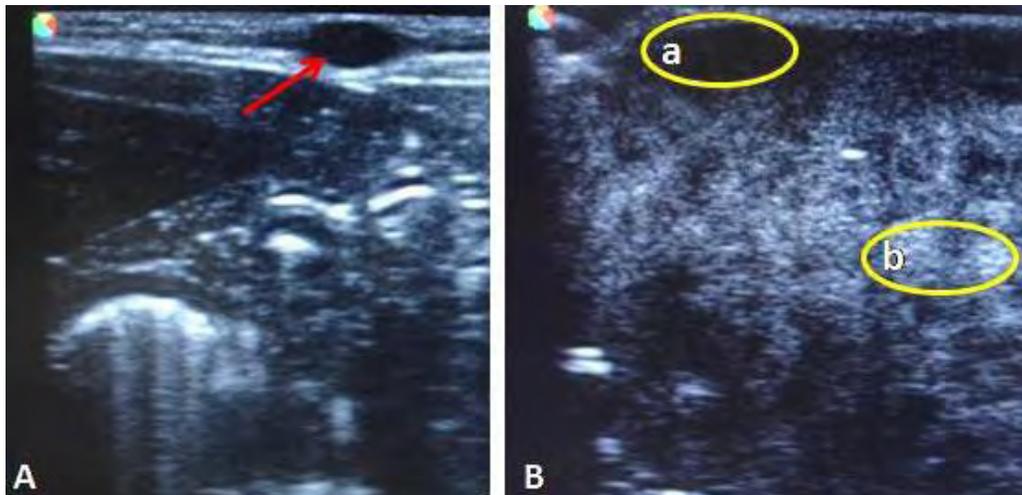
Variáveis	Grupo 1	Grupo 2	Valor p
Velocidade máxima	19,19 $\pm$ 4,72	28,71 $\pm$ 6,83	<b>0,0117<sup>a</sup></b>
Velocidade mínima	7,17 $\pm$ 1,65	10,69 $\pm$ 4,36	<b>0,1172</b>
Índice de resistência	0,66 $\pm$ 0,07	0,71 $\pm$ 0,14	<b>0,8781</b>
Índice de pulsatividade	1,45 $\pm$ 0,33	1,81 $\pm$ 1,12	<b>0,8422</b>

Teste t pareado para médias, em nível de significância 5%.

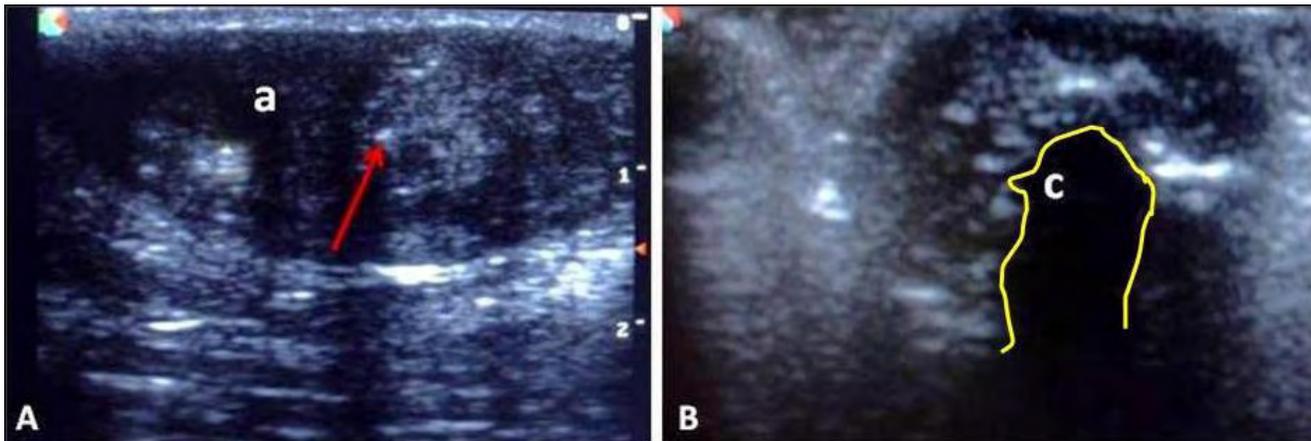
<sup>a</sup> significativo para  $p<0,05$ .



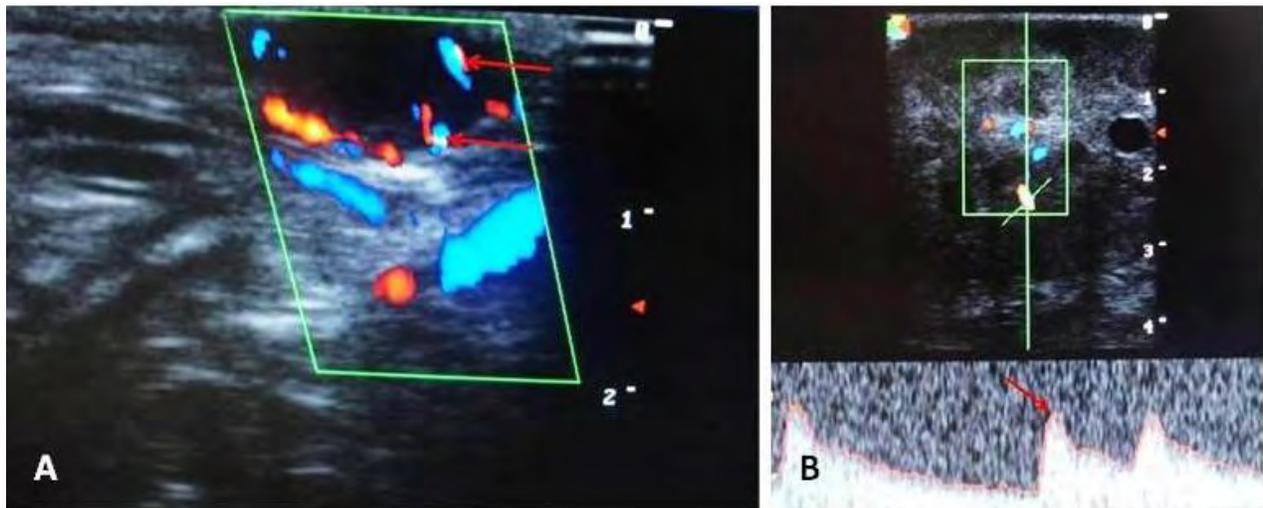
**Figura 2:** Imagem ultrassonográfica de neoplasia mamária em cadela. Notar em (A) regularidade e (B) irregularidade da superfície tumoral (setas).



**Figura 3:** Imagem ultrassonográfica de neoplasia mamária em cadela. Notar em (A) homogeneidade (seta) e (B) heterogenicidade do parênquima tumoral (a: área hipoeecogênica; b: área hipereecogênica).



**Figura 4:** Imagem ultrassonográfica de neoplasia mamária em cadela. Notar em (A) presença de ponto ecogênico (seta) e área cística (a); em (B) presença de sombreamento acústico (C – marcação amarela).

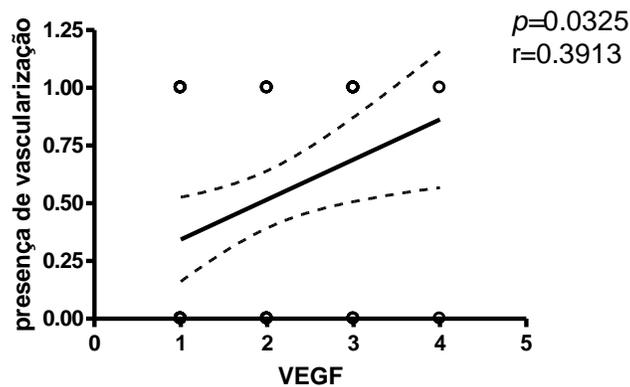


**Figura 5:** Em (A), imagem de modo Doppler em cores de neoplasia mamária em cadela. Notar (setas) presença de neovascularização tumoral; em (B), imagem de modo Doppler Power de neoplasia mamária em cadela. Note (seta) a forma de onda do fluxo sanguíneo para neovascularização tumoral.

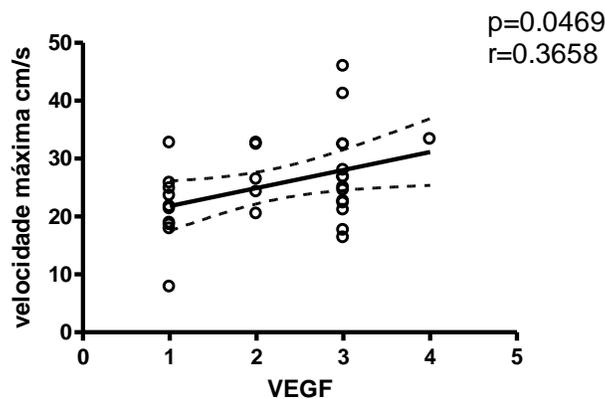
## 5.5 Imunoistoquímica para VEGF

Ao avaliar os valores semiquantitativos de VEGF nas neoplasias mamárias de cadelas, encontrou-se média de  $2,22 \pm 0,89$  para tumores malignos e  $1,66 \pm 0,91$  para benignos. Houve diferença para esta variável entre os grupos ( $p=0,0315$ ).

Por meio da curva de regressão linear dos valores semiquantitativos de VEGF com a presença de vascularização tumoral e com a velocidade máxima do fluxo sanguíneo, verificou-se a presença de correlação positiva para ambos ( $r=0,3913$  e  $r=0,3658$ , respectivamente (Figuras 6 e 7).



**Figura 6:** Representação gráfica da regressão linear dos valores semiquantitativos de VEGF com a presença de vascularização (0: ausência; 1: presença) em neoplasias mamárias de cadela.



**Figura 7:** Representação gráfica da regressão linear dos valores semiquantitativos de VEGF com a velocidade máxima do fluxo sanguíneo de neoplasias mamárias em cadelas.

## **6. DISCUSSÃO**

### **6.1 Histórico reprodutivo**

Ao estudar os dados do histórico reprodutivo das cadelas no experimento, pode-se verificar que a maioria dos animais não era castrada. Esses resultados corroboram com QUEIROGA & LOPES (2002) que comentam uma menor incidência de neoplasias mamária em cadelas castradas. Cadelas que apresentam cios com intervalos irregulares e que receberam administração de contraceptivos apresentam grande probabilidade de manifestarem neoplasias mamárias, devido aos fatores hormonais relacionados com a fisiopatologia da síndrome. Nesse estudo, pôde-se observar uma baixa ocorrência de cadelas com neoplasia mamária que receberam drogas contraceptivas e que apresentavam cios com intervalos regulares, demonstrando o acometimento de tumores em cadelas sem alterações reprodutivas.

### **6.2 Exame físico das neoplasias mamárias**

As características macroscópicas avaliadas no experimento foram importantes para determinar de modo indireto a composição tecidual das neoplasias mamárias. De acordo com NYMAN et al. (2006a), no tocante à realização da avaliação ultrassonográfica dos tumores, é importante conhecer as características macroscópicas e microscópicas do tumor.

A consistência tumoral não está diretamente relacionada ao tipo de tumor de mama encontrado, mas a presença de estruturas firmes ou macias pode estar correlacionada com a presença ou não de áreas císticas na neoplasia. Em tumores de consistência flutuante, as lesões císticas são importantes para a caracterização da homogeneidade do parênquima tumoral característica citada por BASTAN et al. (2009) como importante na diferenciação tumoral. Entretanto, neste experimento não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os tecidos tumorais avaliados com o tipo de consistência tumoral, sendo que a maioria apresentou característica firme à inspeção.

Quanto à regularidade da superfície tumoral, a maioria das neoplasias apresentou margens regulares. Esses dados não concordam com MISDROP et al. (1999) e LANA et al.

(2007), que consideram a presença de irregularidade da superfície tumoral como um forte indicativo para ocorrência de neoplasias malignas.

Em relação ao tamanho tumoral, BASTAN et al. (2009) e NYMAN et al. (2006b) comentam que há diferença significativa entre tumores mamários malignos e benignos. Corroborando com a literatura citada, verificou-se no experimento que as neoplasias mamárias malignas apresentaram tamanhos maiores que tumores benignos. NYMAN et al. (2006) comentam que tumores maiores podem ser decorrência da presença de alterações do parênquima, relacionadas com o grau de malignidade.

LANA et al. (2007) cita que a presença de tumores mamários apresenta maior ocorrência em cadeias abdominais caudais e inguinais. Foi possível verificar a incidência maior de tumores mamários em cadeia inguinal, entretanto não houve correlação significativa da localização tumoral com o tipo de tumor ( $p=0,1404$ ).

De uma maneira geral, as características macroscópicas avaliadas no experimento, exceto o tamanho, não apresentaram significância para diferenciação do tipo de tumor. Esses achados são concordantes com RUTTEMAN & KIRPENSTEIJN (2003) e LANA et al., (2007) que consideram que a ausência desses sinais não garante a benignidade ou malignidade da lesão.

### **6.3 Diagnóstico histopatológico**

Após a avaliação histológica das neoplasias mamárias de cadelas do experimento, pôde-se verificar que o número de tumores malignos foi superior ao de benignos. Esse resultado contraria as citações de QUEIROGA & LOPES (2002) e CARVALHO (2006) que consideram uma frequência equivalente para ocorrência de tumores de mama benignos e malignos em cães.

Os dados obtidos neste estudo são importantes para estudos epidemiológicos e clínicos, pois foi verificada a frequência específica da ocorrência para cada tipo de neoplasia mamária em cadelas. A classificação utilizada no experimento está de acordo com a comentada por MISDROP et al. (1999).

#### 6.4 Ultrassonografia convencional e modo Doppler em cores e *Power*

No presente estudo, não se verificou diferença entre os grupos experimentais para a regularidade da superfície ao exame ultrassonográfico ( $p>0,05$ ). Esse resultado contraria os achados de BASTAN et al. (2009) que relatam presença de regularidade de superfície em tumores benignos e irregularidade em malignos.

Para NYMAN et al. (2006b) a maioria dos autores, a presença de ecogenicidade heterogênea é um indicativo de malignidade para as neoplasias mamárias em cadelas, contrariando os dados encontrados. Sugere-se que a presença de pontos ecogênicos (característica heterogênea) em tumores benignos, esteja relacionada a tipos específicos de neoplasias mistas que possuem em sua constituição elementos como ossos, cartilagens e/ou gorduras, de acordo com LANA et al. (2007).

MISDROP et al. (1999) citam que tumores malignos apresentam múltiplos fatores que direcionam ao diagnóstico de malignidade, mas a ausência desses não exclui essa característica. Sendo assim, pode-se visibilizar, por meio da ultrassonografia, ecogenicidade homogênea no parênquima de neoplasias mamárias malignas.

Corroborando com NYMAN et al. (2006b) a visibilização de áreas císticas em neoplasias mamárias no experimento e outros achados ultrassonográficos (como pontos ecogênicos citados anteriormente) não pode ser utilizada para diferenciar tumores benignos de malignos. Dentro dos achados encontrados no tecido neoplásico no experimento, por meio da ultrassonografia, a única alteração tecidual que pode ser utilizada como para diferenciar os tipos de tumores é a presença de sombreamento acústico, presente em uma neoplasia mamária maligna. Entretanto outros estudos são sugeridos para avaliar a correlação desse achado ultrassonográfico com o diagnóstico de tumores mamários em cadelas.

Contrariando a citação de NYMAN et al. (2006b), a presença de vascularização nos tumores mamários avaliados no experimento, por meio do modo Doppler em cores, não está correlacionada com a malignidade das neoplasias. De acordo com esses autores, em tumores malignos a incidência de neovascularização é maior que em benignos. Cabe comentar que os mesmos autores citam que a visibilização dos vasos depende do seu tamanho, sendo uma limitação para a técnica de imagem. Nesse estudo, devido à utilização

de técnica ultrassonográfica com alta resolução foi possível a visualização de vasos menores, promovendo maior sensibilidade ao diagnóstico da neovascularização.

Corroborando o estudo em medicina humana realizado por DOCK et al. (1991), os picos de velocidade sistólica (velocidade máxima) encontrados no experimento, em tumores de mama, podem indicar a malignidade do tecido. De acordo com esses autores, picos de velocidade sistólica maiores que 20cm/s são característicos de malignidade. Para os valores de velocidade mínima, (IR e PI) não há citação na literatura de índices que possam auxiliar no diagnóstico de tumores.

Para LUCENA (2006), além do aumento da velocidade máxima, a presença de fluxo turbulento é sugestiva de lesões malignas, característica não encontrada no presente estudo ao avaliar os tumores de mama em cadelas.

MARTINS et al. (2002) comentaram que alterações na fluxo sanguíneo tumoral, detectada pelo exame Doppler em cores, pode ser também um indicador de regressão do tumor. Sendo assim, os resultados encontrados por meio do exame Doppler, podem ser importantes para o diagnóstico do tipo de neoplasias mamária em cadelas e também para avaliação do tratamento dos tumores com drogas que atuem no suprimento sanguíneo para o tecido tumoral.

## **6.5 Imunoistoquímica para VEGF**

Os resultados obtidos no presente estudo concordam com GRAHAM & MYERS (1999). Esses autores propuseram que o VEGF é um indicador do diagnóstico tumoral e do prognóstico para as neoplasias mamárias em cães.

Ao correlacionar a presença do VEGF com o exame de Doppler no tecido tumoral verificou-se a característica dessa proteína citada por RESTUCCI et al. (2002) e LUCENA (2006), na qual o fator de crescimento endotelial vascular estimula a neovascularização.

Outro resultado importante encontrado foi a relação da velocidade máxima em neoplasias com o VEGF no tecido tumoral. A possibilidade de que o VEGF interfira na velocidade do fluxo sanguíneo tumoral ainda não foi estudada em veterinária. Pode-se inferir que as alterações provocadas pelo VEGF na parede do endotélio tumoral formado (aumento da permeabilidade e dilatação dos vasos) citada por PLATE (2001), possam estar ligadas á

correlação com a velocidade do fluxo sanguíneo tumoral (BATES, 2002). Sugerem-se outros estudos que possam esclarecer a relação do fator de crescimento endotelial com a hemodinâmica tumoral.

## **7. CONCLUSÃO**

Concluiu-se que a utilização do modo Doppler é útil no auxílio da diferenciação de neoplasias mamárias malignas e benignas em cadelas, por meio da avaliação dos índices vasculares.

## 8. REFERÊNCIAS

BARRA, A.A.; SILVA, S.Z.C.; GOUVÊA, A.P.; et al. A mamografia e a ultra-sonografia no diagnóstico de lesões mamárias palpáveis suspeitas de malignidade. **Revista de Medicina de Minas Gerais**, v.14, n.3, p.166-170, 2004.

BASTAN, A.; ÖZENÇ, E.; PIR YAGCI, I.; et al. Ultrasonographic evaluation of mammary tumors in bitches. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v.1, n.15, p.81-86, 2009.

BULNES, A.G.; FERNANDEZ, P.G.; AGUIRRE, A.M.M.; et al. Ultrasonographic imaging of canine mammary tumours. **The Veterinary Record**, v.143, n.25, p.687-689, 1998.

CALAS, M.J.G.; KOCH, H.A.; DUTRA, M.V.P. Breast ultrasound: evaluation of echographic criteria for differentiation of breast lesions. **Radiologia Brasileira**, v.40, n.1, p.1-7, 2007.

CARVALHO, C.F.; CHAMMAS, M.C.; GIOVANNI, G.C. Princípios físicos do doppler em ultra-sonografia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.872-879, 2008.

CARVALHO, T.B. **Neoplasia mamária em cadelas: caracterização histopatológica e expressão de proteínas de estresse (HSP 72)**. 49f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

DOCK, W.; GRABENWOGER, F.; METZ, V.; et al. Tumor vascularization: assessment with Duplex Sonography. **Radiology**, v.181, p.241–244, 1991.

FEIGENBAUM, H. Instrumentation. In: \_\_\_\_\_. **Echocardiography**. 4.ed. Philadelphia. Lea and Febiger, 1986. cap.1, p.1-49.

FELICIANO, M.R.A.; VICENTE, W.R.R.; LEITE, C.A.L.; et al. Abordagem ultrassonográfica da neoplasia mamária em cadelas: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.3, p.197-201, 2008.

FINN-BODNER, S.T.; HUDSON, J.A. Abdominal vascular sonography. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.28, n.4, p.887-941, 1998.

GRAHAM, J.C.; MYERS, R.K. The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.13, n.5, p.416-418, 1999.

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

LUCENA, C.E.M. **Índice de avaliação ecográfica no estudo dos nódulos sólidos mamários – uma nova proposta de classificação**. 152f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

MARGI M.H.; NEWLAND A.C. Angiogenesis and angiogenic mediators in haematologic malignancies. **British Journal of Haematology**, v.1, n.111, p.43-51, 2000.

MARTINS, D.C.; FERREIRA, A.M.R. Marcadores prognósticos como um auxílio à conduta clínico-cirúrgica em uma cadela apresentando múltiplos nódulos mamários. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.189-191, 2003.

MARTINS, M.S.; SOUZA, G.A.; DERCHAIN, S.F.M. et al. Avaliação da resposta do câncer de mama à quimioterapia: papel da ultra-sonografia e da dopplerfluxometria. **RBGO**, v.24, n.7, p.447-452, 2002.

MEIS, E.; LEVY, R.A. Câncer e trombose: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.2, p.183-193, 2007.

MISDROP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E.; et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. In: **World Health Organization international histological classification of tumors of domestic animals** 2ed. v.VII. Washington, D.C. Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, 1999.

NYMAN, H.T.; KRISTENSEN, A.T.; LEE, M.H.; et al. Characterization of canine superficial tumors using gray-scale b mode, color flow mapping, and spectral doppler ultrasonography-a multivariate study. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v.47, n.2, p.192-198, 2006a.

NYMAN, H.T.; NIELSEN, O.L.; MCEVOY, F.J.; et al. Comparison of B-mode and Doppler ultrasonographic findings with histologic features of benign and malignant mammary tumors in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.67, n.6, p.985-991, 2006b.

NYLAND, T.G.; MATTOON, J.S. Physical principles, instrumentation and ultrasound diagnosis safety. In:\_\_\_\_\_. **Small animal diagnostic ultrasound**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 2002. cap.1, p.1-19.

PAULINELLI, R.R.; VIDAL, C.S.R.; RUIZ, A.N. et al. Estudo prospectivo das características sonográficas no diagnóstico de nódulos sólidos da mama. **RBGO**, v.24, n.3, p.195-199, 2002.

PLATE K.H.; From angiogenesis to lymphoangiogenesis. **Nature Medicine**, v.2, n.7, p.151-152, 2001.

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

REBÊLO, A.M.G. **Carcinoma ductal invasor de mama: relação da expressão imunoistoquímica do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e do**

**oncogene BCL-2 com o tamanho tumoral e status dos linfonodos sentinelas no momento do diagnóstico histopatológico da neoplasia.** 74f. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

RESTUCCI, B.; PAPPARELLA, S.; MAIOLINO, P.; et al. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.39, p.488–493, 2002.

RESTUCCI, B.; VICO, G.; MAIOLINO, P. Evaluation of angiogenesis in canine mammary tumors by quantitative PLATElet endothelial cell adhesion molecule immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v.37, p.297–301, 2000.

RUTTEMAN, G.R.; KIRPENSTEIJN, J. Tumours of the mammary glands. In: DOBSON, J.M. & LASCELLES, B.D.X., **BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology**, 2ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, 2003. p. 234-242.

SAS Institute. **SAS/STAT user's guide**. 5.ed. Cary: Statical Analysis System Institute, v.1, 1990, p.956.

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

SIQUEIRA, F.M.P. **Correlação entre o exame clínico, a mamografia e a ultra-sonografia com o exame anátomo-patológico na determinação do tamanho tumoral no câncer de mama.** 90f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

SZATMÁRI, V.; SÓTONYI, P.; VOROS, K. Normal duplex Doppler waveforms of major abdominal blood vessels in dogs: a review. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v.42, n.2, p.93-107, 2001.

TURLEY, H.; SCOTT, P.A.; WATTS, V.M.; et. al. Expression of VEGF in routinely fixed material using a new monoclonal antibody VG1. In: *The Journal of Pathology*, v.186, n.3, p.313-318, 1998.

TRASCH, K.; WEHREND, A.; BOSTEDT, H. Ultrasonographic description of canine mastitis. ***Veterinary Radiology & Ultrasound***, v.48, n.6, p.580–584, 2007.

VERMILLON, R.P. Basic physical principles. In: SNIDER, A.R. et al. ***Echocardiography in pediatric heart disease***. 2.ed. Missouri: Mosby, 1997. cap.1, p.1-10.

ZUCCARI, D.A.P.C.; PAVAM, M.V.; CORDEIRO, J.A.; et al. A imunoexpressão das citoqueratinas como marcadores diagnósticos e prognósticos nas neoplasias mamárias caninas. ***Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias***, v.99, n.551, p.173-178, 2004.

ZUKI, A.B.Z.; BOYD, J.S. Ultrasonographic imaging of neoplasia of the canine mammary glands and their regional lymph nodes. ***Journal of Animal and Veterinary Advances***, v.3, n.9, p.605-613, 2004.