



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

ANALY RAMOS MENDES FERRARI

**EFEITOS DA QUIMIOTERAPIA METRONÔMICA SOBRE
ANGIOGÊNESE E LINFANGIOGÊNESE DE CARCINOMAS
MAMÁRIOS DE CADELAS**

Araçatuba

2019

ANALY RAMOS MENDES FERRARI

**EFEITOS DA QUIMIOTERAPIA METRONÔMICA SOBRE
ANGIOGÊNESE E LINFANGIOGÊNESE DE CARCINOMAS
MAMÁRIOS DE CADELAS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais).

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto

Coorientador: Prof. Associado Alexandre Lima de Andrade

**Araçatuba
2019**

F375e

Ferrari, Analy Ramos Mendes

Efeitos da quimioterapia metronômica sobre angiogênese e linfangiogênese de carcinomas mamários de cadelas. / Analy Ramos Mendes Ferrari. -- Araçatuba, 2019

67 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto

Coorientador: Prof. Associado Alexandre Lima de Andrade

1. Cães. 2. Mama. 3. Neoplasias. 4. Quimioterapia adjuvante. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


Título: Efeitos da quimioterapia metronômica sobre a angiogênese e linfangiogênese de carcinomas
mamários de cadelas

AUTORA: ANALY RAMOS MENDES FERRARI
ORIENTADORA: MARIA CECILIA RUI LUVIZOTTO
COORIENTADOR: ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARIA CECILIA RUI LUVIZOTTO
Aposentada da Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. FLÁVIA DE REZENDE EUGÊNIO
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. ANTONIO HENRIQUE OLIVEIRA POLETTO
Curso de Medicina / Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium Araçatuba


Prof. Dr. JOSÉ CÂNDIDO CALDEIRA XAVIER JÚNIOR
Curso de Medicina / Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium Araçatuba

Araçatuba, 16 de abril de 2019.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Maria Socorro Ramos da Silva Mendes
e Antonio Olegario Mendes (in memoriam) e ao
meu marido Heitor Flavio Ferrari.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades e pelo suporte nos momentos de dificuldades.

À toda minha família, em especial minha mãe que mesmo com dificuldades se manteve forte em me dar forças para prosseguir. Ao meu amado pai (*in memoriam*) que partiu durante a execução desta pesquisa e que, muitas vezes, teve que me dividir com a pós-graduação, mesmo nas circunstâncias de sua doença, que o senhor possa se orgulhar daí de cima. Te amo eternamente. Às minhas irmãs pela força e compreensão da minha ausência. Amo todos vocês.

Ao meu amado marido, futuro pai do nosso primeiro filho Augusto. Você foi meu porto seguro durante toda a pós-graduação e carreira. Se manteve forte e me apoiando em todas as decisões. Deixo aqui meu agradecimento pela paciência e por sempre acreditar em mim. Te amo.

Ao meu primeiro filho Augusto que está sendo gerado em meu ventre e foi o meu impulso principal para persistir com este estudo. Já te amo mais do que tudo.

À minha orientadora Profa. Maria Cecília que mais uma vez se mostrou dedicada ao ensino e à pesquisa, demonstrando amor pela profissão e pela docência. A senhora é um exemplo a seguir de ética e dedicação. Muito obrigada!!

Ao meu coorientador Prof. Alexandre Lima por ter aceitado me coorientar e pela confiança depositada em mim desde o mestrado.

Ao diretor, professores e funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, pelo suporte quando necessário.

Ao professor Marcelo e seu orientado Alex pelo “empréstimo” do microscópio para detecção das fotomicrografias.

À professora Gisele Fabrino pelo “empréstimo” da panela para imunohistoquímica.

Aos proprietários e animais participantes do projeto, obrigada pela confiança. Acima de ser uma tese de doutorado, o meu intuito foi de buscar mais uma opção terapêutica para as cadelas que sofrem com tumores de mama.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro ao projeto (Proc. Número 2017/07865-8).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da FMVA da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Meus sinceros agradecimentos!

"No meio da confusão, encontre a simplicidade.

A partir da discórdia, encontre a harmonia.

No meio da dificuldade reside a oportunidade."

(Albert Einstein)

FERRARI, A.R.M. **Efeitos da quimioterapia metronômica sobre angiogênese e linfangiogênese de carcinomas mamários de cadelas.** 2019. 67f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

Nas últimas décadas biomarcadores de angiogênese e linfangiogênese tumoral são alvos de estudos e, em humanos, estes aspectos da vasculatura tumoral já são utilizados como fatores prognósticos em neoplasias mamárias. Em cadelas não há estudos suficientes para demonstrar o significado clínico-patológico da linfangiogênese em neoplasias mamárias. De maneira similar, não há estudos que demonstrem efeitos antilinfangiogênicos de terapias como a quimioterapia metronômica (QM), classicamente caracterizada como uma terapia antiangiogênica. Este estudo teve como objetivos estabelecer os efeitos da QM na angiogênese e linfangiogênese tumoral destas neoplasias, assim como obter o significado clínico-patológico da densidade de vasos linfáticos em neoplasias mamárias caninas. Foram utilizadas 40 cadelas portadoras de carcinomas mamários, divididas em dois grupos, sendo um tratado somente com mastectomia e outro tratado com quimioterapia metronômica (QM) seguida de mastectomia. A biópsia do linfonodo sentinela foi preconizada para estabelecimento do “status” do tecido linfoide sentinela. Após, foi realizada a classificação e graduação histopatológica das neoplasias, e procedeu-se a imunomarcagem para determinar a densidade de vasos linfáticos (DVL), a densidade microvascular (DMV), índice de proliferação celular (IP), índice apoptótico (IA), escore de COX-2, grau do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e metástase nodal. As imunomarcações foram comparadas entre os grupos e a DVL comparada com aspectos clínico-patológicos. Foram observados efeitos antiangiogênicos e pró-apoptóticos no grupo tratado com QM, porém sem efeitos antilinfangiogênicos no mesmo grupo. Foi observada associação da DVL com metástase nodal, VEGF e forte correlação com IP demonstrando possíveis efeitos da linfangiogênese tumoral com prognóstico e progressão tumoral. Obteve-se maior sobrevida global no grupo tratado com QM demonstrando eficácia da terapia para neoplasias mamárias caninas.

Palavras-chave: Cães, mama, neoplasias, quimioterapia adjuvante.

FERRARI, A.R.M. **Effects of metronomic chemotherapy on angiogenesis and lymphangiogenesis of canine mammary carcinomas**. 2019. 67f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

In recent decades biomarkers of tumor angiogenesis and lymphangiogenesis have been studied and, in humans, these aspects of tumor vasculature are already used as prognostic factors in breast cancer. In bitches there are no studies that prove the clinicopathological significance of lymphangiogenesis in mammary neoplasms. Similarly, there are no studies demonstrating anti-lymphangiogenic effects of therapies such as metronomic chemotherapy (MC), classically characterized as anti-angiogenic therapy. This study aimed to establish the effects of MC on tumor angiogenesis and lymphangiogenesis of these neoplasms, as well as to obtain the clinical-pathological significance of lymphatic vessel density in canine mammary tumors. Forty bitches with mammary carcinomas were used, divided into two groups, one treated with mastectomy and the other treated with MC followed by mastectomy. Sentinel lymph node biopsy was recommended for establishing the status of the sentinel lymph node. Afterwards, classification and histopathological graduation of the neoplasms was performed, followed by immunostaining and determination of lymphatic vessel density (LVD), microvascular density (MVD), cell proliferation index (PI), apoptotic index (AI), COX-2 score, and vascular endothelial growth factor (VEGF) grade. Immunostain were compared between the groups and the LVD compared to clinicopathological aspects. Antiangiogenic and pro-apoptotic effects were observed in the group treated with MC, but without anti-lymphangiogenic effects in the same group. It was observed an association of LVD with nodal metastasis, VEGF and a strong correlation with PI demonstrating possible effects of tumor lymphangiogenesis and association with prognosis and tumor progression. Longer overall survival was obtained in the group treated with MC demonstrating efficacy of the therapy for canine mammary tumors.

Keywords: Adjuvant chemotherapy, breast, dogs, neoplasia.

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1 - Drenagem linfática das glândulas mamárias caninas.	19
Figura 2 - A densidade microvascular reflete a distância intercapilar. Este esquema de uma secção de tumor com dois vasos, ilustra a distância intercapilar (indicada pela seta amarela). Assim, a densidade microvascular, é influenciada por fatores angiogênicos e não angiogênicos.	22
Figura 3 - Heterogeneidade dos vasos linfáticos (VLs) associados ao tumor. Linfangiogênese induzida pelas interações entre células tumorais, macrófagos, células B, células T e matriz extracelular (MEC). A linfangiogênese tumoral ocorre principalmente via brotamento de células endoteliais linfáticas (CEL) pré-existent e, em alguns casos, células endoteliais linfáticas progenitoras (CELP). Além disso, o aumento dos VLs induzido por tumor e a linfangiogênese no linfonodo (nicho “pré-metastático”) promovem a metástase tumoral.	23
Figura 4 - Técnica da biópsia do linfonodo sentinela. (A) - Aplicação intradérmica do corante azul patente V (2,5%) com agulha hipodérmica. (B) - Nota-se que a lesão foi dividida subjetivamente em quatro quadrantes para aplicação do corante.	36
Figura 5 - Técnica da biópsia do linfonodo sentinela. (A) - Visualização dos vasos linfáticos demarcados pelo corante azul patente V indicando a localização do linfonodo sentinela na região axilar esquerda. (B) - Evidenciação de marcação bilateral de vasos linfáticos pelo corante aplicado em uma neoplasia em mama inguinal esquerda (asterisco), indicando a área drenante pelos linfonodos sentinelas.	37
Figura 6 - Fotomicroscopia das neoplasias mamárias (20x, HE). (A) – Carcinoma mamário tubular de grau I. (B) – Carcinoma papilar invasivo de grau I. (C) – Carcinoma mamário de células escamosas de grau III caracterizado por alto pleomorfismo, moderado índice mitótico e queratinócitos atípicos. (D) –Linfonodo sentinela de neoplasia mamária apresentando área de metástase (asterisco).	38

- Figura 7 -** Fotomicroscopia das reações imuno-histoquímicas (DAB/Hematoxilina). (A) – Imunomarcção positiva para CD31 evidenciando microvasos em carcinoma mamário (40x). (B) – Carcinoma mamário com grau II de imunomarcção para VEGF (40x). (C) – Células neoplásicas em proliferação apresentando marcação nuclear por Ki67 (20x). (D) – Carcinoma mamário com alto escore de imunomarcção para COX-2 (40x). 39
- Figura 8 -** Diferença entre densidade microvascular (DMV) e índice apoptótico (IA) dos carcinomas mamários entre os grupos. (A) – Observa-se diferença ($p < 0,05$) na DMV entre os grupos, teste T de Student. (B) – IA com diferença estatística entre os grupos, teste Mann-Whitney ($p < 0,05$). 40
- Figura 9 -** Correlação entre as Densidades de Vasos Linfáticos (DVL) entre os grupos. (A) - Correlação entre a DVL intratumoral (IT) entre os grupos. (B) - Correlação entre a DVL peritumoral (PT) entre os grupos. Teste Kruskal-Wallis ($p < 0,01$). 41
- Figura 10 -** Fotomicroscopia evidenciando imunomarcção positiva para vasos linfáticos. (A) - Tecido mamário canino normal, com áreas bem delimitadas dos vasos linfáticos (asteriscos), imunomarcados pelo anticorpo anti-Prox-1, IHQ (40x, DAB/Hematoxilina). (B) - Carcinoma mamário canino, com áreas imunomarcadas pelo anticorpo anti-Prox-1 indicando as células endoteliais imunomarcadas dos vasos linfáticos peritumorais (asteriscos), IHQ (40x, DAB/Hematoxilina). 43
- Figura 11 -** Correlação positiva ($p = 0,01$) entre a Densidade de Vasos Linfáticos (DVL) intratumoral (IT) e o Índice de Proliferação (IP) detectado por imunomarcção com Ki67. Teste de correlação de Spearman ($p < 0,05$). 43
- Figura 12 -** Curva de Kaplan-Meier da sobrevida total do grupo tratado com quimioterapia associada à mastectomia (GQ) versus grupo tratado somente com mastectomia (GM). O tempo médio de sobrevida do GQ foi significativamente maior (1098 dias) quando comparado ao GM (830 dias) ($p = 0,01$). 44

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1 - Descrição do sistema TNM	17
Tabela 2 - Estadiamento dos tumores mamários caninos	17
Tabela 3 - Sumário dos protocolos imuno-histoquímicos	33
Tabela 4 - Alterações clínicas e laboratoriais referentes à toxicidade observada nos pacientes do Grupo Quimioterapia	36
Tabela 5 - Associação entre DVL (IT e PT) e as variáveis clínico-patológicas para as neoplasias mamárias do grupo mastectomia	42

LISTA DE ABREVIATURAS

% – Porcentagem

ALT – Alanina aminotransferase

AP – Azul patente

BLS – Biópsia do linfonodo sentinela

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

cm – Centímetros

COX-2 – Ciclooxigenase-2

DAB – Diaminobenzidina

DMT – Dose máxima tolerável

DMV – Densidade microvascular

DVL – Densidade de vasos linfáticos

Edta – Ácido etilenodiamino tetra-acético

et al. – E outros

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

FOA – Faculdade de Odontologia de Araçatuba

GC – Grupo controle

GM – Grupo mastectomia

GQ – Grupo quimioterapia

HE – Hematoxilina eosina

HER-2 – Receptor do fator de crescimento epidermal humano do tipo 2

HRP – Horseradish Peroxidase

IA – Índice apoptótico

IHQ – Imuno-histoquímica

IP – Índice de Proliferação

IT – Intratumoral

Kg – Quilogramas

LS – Linfonodo sentinela

m² – Metro quadrado

mg – Miligramas

n – Número de animais

NMC – Neoplasia mamária canina

O₂ – Oxigênio

OMS – Organização Mundial da Saúde

OSH – Ovário-salpingohisterectomia

p – Probabilidade de significância

pH – Potencial hidrogeniônico

PT – Peritumoral

QM – Quimioterapia metronômica

SP – São Paulo

TGF- β – Fator de crescimento transformador β

TNM – Sistema tumor, neoplasia, metástase

TRIS – Tris (hidroximetil) aminometano

UNESP – Universidade Estadual Paulista

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-3 – Receptor do fator de crescimento endotelial vascular-3

VL – Vaso Linfático

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Neoplasia mamária canina	16
2.2 Drenagem linfática e linfonodo sentinela	18
2.3 Angiogênese tumoral.....	20
2.4 Linfangiogênese tumoral	22
2.5 Terapia da neoplasia mamária canina.....	24
3 OBJETIVOS.....	27
4 HIPÓTESES	28
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
5.1 Animais	29
5.2 Características clínicas.....	29
5.3 Grupos	29
5.4 Quimioterapia metronômica (QM).....	30
5.5 Cirurgia	30
5.6 Técnica da biópsia do linfonodo sentinela (BLS)	31
5.7 Histopatologia	31
5.8 Imuno-histoquímica	32
5.8.1 COX-2, VEGF, Ki67 e Caspase-3	32
5.8.2 Densidade microvascular (DMV).....	32
5.8.3 Densidade de vasos linfáticos (DVL).....	33
5.8.4 Metástase nodal.....	33
5.9 Acompanhamento e sobrevida	34
5.10 Análise estatística	34
6 RESULTADOS	35
6.1 Características clínicas.....	35
6.2 Efeitos adversos da quimioterapia metronômica	35
6.3 Aplicabilidade e sensibilidade da técnica de biópsia de linfonodo sentinela	35
6.4 Histopatologia	38
6.5 Imuno-histoquímica	39
6.6 Sobrevida total	44
7 DISCUSSÃO.....	45
8 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICE A - FICHA DE TUMORES DE MAMA EM CADELAS.....	64
ANEXO 1 – COMITÊ DE ÉTICA.....	67

1 INTRODUÇÃO

Em cadelas adultas intactas, o tumor de mama é o mais comum tipo de neoplasia, possuindo uma malignidade superior a 50% dos casos (PENÃ et al., 2014). Embora a prevalência desta enfermidade tenha diminuído em países onde se pratica a castração profilática precoce, a neoplasia mamária canina (NMC) ainda se faz, mundialmente, um importante objeto de estudo (SLEECKX et al., 2011). A progressão da neoplasia mamária em cadelas correlaciona-se com a influência hormonal do organismo animal e a prática da OSH precoce é um importante recurso profilático, assim como adjuvante ao tratamento em pacientes selecionados (SORENMO; SHOFER; GOLDSCHMIDT, 2000). Essa ressalva se faz inerente em países de terceiro mundo, como o Brasil, no qual a prática profilática precoce de ovariio-salpingohisterectomia (OSH) em cadelas não é uma realidade.

A carcinogênese da neoplasia mamária em mulheres e em animais de companhia, além de envolver os fatores hormonais, ainda inclui aspectos de angiogênese tumoral e, possivelmente, linfangiogênese tumoral, sendo estes últimos aspectos motivo de estudos na atualidade, inclusive desta pesquisa.

Em seres humanos, o estudo detalhado da angiogênese tumoral é feito especialmente no câncer de mama na mulher. Já em cadelas, estes estudos têm aumentado na última década, havendo detalhes a serem esclarecidos de como ocorre esse processo na espécie canina (SLEECKX et al., 2014a). A linfangiogênese, definida como o crescimento de novos vasos linfáticos, ocorre na maioria das neoplasias e é considerada essencial para o crescimento, invasão e metástase tumoral (SLEECKX et al., 2014b). O estudo da linfangiogênese na carcinogênese tumoral, assim como o estudo de terapias que inibam este processo ainda é extremamente escasso na literatura.

Aliado à OSH, a mastectomia é o tratamento inicial de eleição para a maioria dos animais portadores de tumores mamários, assim como na mulher. Apesar de cadelas e gatas serem modelos de estudos experimentais para o câncer de mama na mulher, a terapia para a NMC ainda é restrita à cirurgia e, quando comparada ao tratamento na mulher, observa-se que existe escassez de estudos sobre terapêutica oncológica na cadela.

Para a terapêutica da NMC, além da mastectomia são descritos na literatura protocolos quimioterápicos de uso convencional, baseados no uso da dose máxima tolerável. A quimioterapia metronômica (QM) consiste na utilização contínua de alguns fármacos em um esquema de administração frequente e em doses muito mais baixas do que as convencionais, retirando-se os longos intervalos entre os ciclos de quimioterapia (BROWDER et al., 2000).

Dessa forma, a QM controla a resistência aos quimioterápicos, exhibe sinergismo, quando combinada com agentes antiangiogênicos e controla o crescimento tumoral, pela inibição das células endoteliais e das células progenitoras endoteliais circulantes (BERTOLINI; PAUL; MANCUSO, 2003; BILLER, 2014). Além disso a quimioterapia metronômica apresenta ainda efeito antiangiogênico e pró-apoptótico (MENDES, 2014).

Os efeitos antilinfangiogênicos da quimioterapia metronômica em neoplasias mamárias em cadelas ainda não foram estudados, assim como a validade da marcação da densidade de vasos linfáticos como marcadores prognósticos para a espécie. Devido à escassez de pesquisas sobre este tema, o presente estudo teve como objetivos estudar o papel da angiogênese e linfangiogênese tumoral em neoplasias mamárias caninas, assim como a influência da quimioterapia metronômica sobre estes aspectos vasculares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasia mamária canina

A neoplasia mamária canina (NMC) é o tipo de tumor que mais comumente afeta cadelas não castradas. A idade média de ocorrência está entre 8 a 11 anos, com raras ocorrências em cadelas com menos de quatro anos, sendo algumas raças predispostas como Poodles, Teckels e os sem raça definida (GOTTWALD; ZUR; HUND, 1998; MENDES, 2014).

Os tumores mamários constituem aproximadamente 52% de todas as neoplasias na cadela, sendo que 50% destes nódulos são malignos agravando o prognóstico, porém evidências histológicas de malignidade não necessariamente implicam em um curso clínico agressivo (BRODEY; GOLDSCHMIDT; ROSZEL, 1983; De NARDI et al. 2002).

Há relatos de predisposição genética baseados em sequências de genes associadas ao aparecimento de tumores mamários, que também foram descritos no genoma humano e ainda mutações genéticas em células previamente normais (RIVERA; EULER, 2011). Também há indícios de que pseudociese e administração de progestágenos possam estar correlacionadas ao aparecimento de neoplasias nas mamas de cadelas, assim como o efeito protetor da castração precoce de cadelas em relação à ocorrência de neoplasia mamária (MISDORP, 1998; OLIVEIRA et al., 2003).

Carcinomas mamários comumente provocam metástases pela via linfática aos linfonodos regionais e pulmões, e a extensão e a localização da metástase determinam a ocorrência e severidade dos sinais clínicos (LANA et al., 2007; MISDORP, 2002; SORENMO, 2003).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs o sistema TNM de classificação para o estadiamento clínico para mulheres acometidas por tumores de mama malignos. Tal sistema também é aplicado às cadelas acometidas por neoplasias mamárias. O objetivo do mesmo é classificar o paciente em grupos por grau de aparente extensão da doença, com base no tamanho da lesão primária (T), disseminação para linfonodos regionais (N) e presença de metástases distantes (M) (Tabela 1) (CASSALI et al., 2014). O estadiamento do paciente deve ser realizado antes do início da terapia. Desta forma, analisa-se a fase de evolução tumoral e a capacidade de progressão do tumor, tanto no sítio primário quanto à distância (Tabela

2). Chang et al. (2005) demonstraram que o uso do sistema TNM fornece informações relativas ao prognóstico e sobrevida de cadelas acometidas por carcinomas mamários, sendo que, casos mais avançados da doença, apresentam prognósticos menos favoráveis que os casos mais iniciais, segundo o sistema indicado.

Tabela 1 - Descrição do sistema TNM

Sistema TNM	
Tamanho	
Tx	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
T1	Tumor confinado no sítio primário
T2	Invasão dos tecidos adjacentes pelo tumor
T3	Tumor com mais de 4cm em sua maior dimensão
Linfonodos regionais	
Nx	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos
N1	Envolvimento de linfonodo regional
N2	Envolvimento de linfonodo distante
Metástases distantes	
Mx	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase no mesmo órgão ou cavidade acometida pelo tumor primário
M2	Metástase à distância

Fonte: adaptada de CASSALI et al. (2014).

Tabela 2 - Estadiamento dos tumores mamários caninos.

Estadiamento tumoral	Apresentação do tumor
I	T1, N0, M0
II	T2, N0, M0
III	T3, N0, M0
IV	Qualquer T, N1, M0
V	Qualquer T, Qualquer N, M1

Fonte: OWEN (1980).

O diagnóstico completo da NMC deve incluir avaliação hematológica e bioquímica sérica, avaliação citológica de aspirado por agulha fina da neoplasia e dos linfonodos regionais (quando aumentados de volume), e, para pesquisa de metástase, técnicas de imagem como radiografia torácica e ultrassonografia abdominal (LANA et al., 2007; SLEECKX et al., 2011). A histopatologia é imprescindível para o diagnóstico definitivo e classificação do tumor e, se múltiplos nódulos estão presentes em um

mesmo animal, eles devem ser avaliados individualmente (MISDORP, 2002; SORENMO, 2003; SORENMO et al., 2009). A histopatologia também auxilia na obtenção do prognóstico do paciente já que a classificação histopatológica assim como a graduação destas neofomações é bastante variável e intimamente correlacionada ao prognóstico (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

Fatores prognósticos podem ser características biológicas, clínicas ou patológicas das neoplasias que permitem predizer a evolução e sobrevida dos pacientes caninos acometidos, além de determinar a necessidade de terapia adjuvante ao procedimento cirúrgico. Diversos são os fatores prognósticos utilizados em medicina veterinária para auxiliar na determinação da malignidade dos diferentes tipos de neoplasias mamárias. Estes fatores podem ser representados pela determinação do tamanho do tumor; “status” do linfonodo sentinela; tipo e graduação histopatológica; e por marcadores moleculares como receptores hormonais, marcadores do índice de proliferação celular (Ki67), receptor do fator de crescimento epidermal humano do tipo-2 (HER-2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e marcadores de angiogênese tumoral (CASSALI et al., 2014).

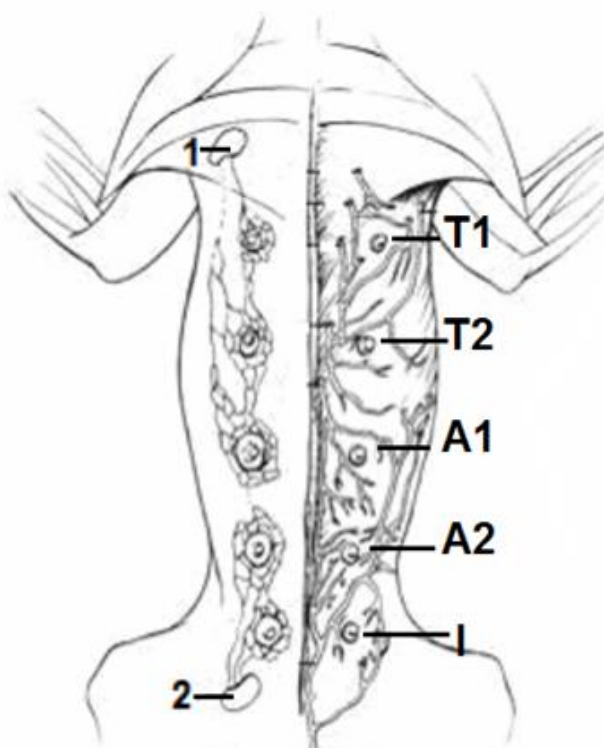
2.2 Drenagem linfática e linfonodo sentinela

O sistema linfático é responsável pela homeostasia do organismo sendo responsável pela drenagem de plasma que extravasa dos capilares sanguíneos até o espaço intersticial, retornando-os à circulação sanguínea (RAHMAN; MOHAMMED, 2015). Devido às características intrínsecas dos vasos linfáticos, como fluxo lento e alta permeabilidade, a disseminação de células tumorais é facilitada por esta via quando comparada aos vasos sanguíneos, o que faz o estudo deste sistema tão importante em oncologia (RAHMAN; MOHAMMED, 2015).

A drenagem linfática é feita através dos linfonodos, que funcionam como filtros para substâncias nocivas que são transportadas pelos vasos linfáticos (REESE et al., 2011). Nas glândulas mamárias de cadelas, o linfonodo axilar drena as três glândulas craniais ipsilaterais, já o linfonodo inguinal superficial, que também recebe a denominação linfonodo mamário, drena as duas glândulas caudais ipsilaterais (REESE et al., 2011). Este linfonodo é palpável na base da glândula mamária inguinal (Figura 1) (REESE et al., 2011).

Existe comunicação entre as glândulas mamárias de cadelas através da drenagem linfática. Desta maneira, é possível salientar que devido à comunicação entre os vasos linfáticos, a disseminação de células tumorais entre um complexo mamário e outro e até mesmo entre as cadeias mamárias é facilitada (REESE et al., 2011). Mas ainda existem discussões sobre a direção da drenagem e comunicações linfáticas entre as glândulas mamárias dos canídeos, decorrentes de alterações anatômicas que impossibilitam o estabelecimento de um padrão de drenagem para a espécie (BESERRA, 2014).

Figura 1 – Drenagem linfática das glândulas mamárias caninas



1- Linfonodo axilar; 2- Linfonodo inguinal superficial; T1 – Glândula mamária torácica cranial; T2 - Glândula mamária torácica caudal; A1 - Glândula mamária abdominal cranial; A2 - Glândula mamária abdominal caudal; I - Glândula mamária inguinal.

Fonte: adaptada de PINTO (2009).

Apesar do conhecimento dos linfossomos mamários, sítios regionais de drenagem linfática, inúmeros estudos têm revelado que a presença de tumores pode alterar significativamente a drenagem linfática da mama, uma vez que animais portadores de neoplasias mamárias passam por uma reconfiguração linfática, que se deve, em grande parte, à presença de fatores pró-lymfangiogênicos no sítio tumoral

(BESERRA, 2014; MATOS et al., 2012; PATSIKAS et al., 2006; SORENMO et al., 2011; SUAMI et al., 2013). Por este fato, torna-se difícil estabelecer quais linfonodos e mamas devem ser removidos durante o procedimento cirúrgico de mastectomia e a ressecção cirúrgica aleatória pode não ser eficiente para prevenção de metástases.

O linfonodo sentinela (LS) é o primeiro linfonodo em uma cadeia linfática regional a receber a linfa de um tumor primário, portanto, será o primeiro a conter uma metástase e sua biopsia revela com precisão o “status” nodal. Assim, se na biopsia do linfonodo sentinela (BLS) não forem encontradas células tumorais, o restante da cadeia nodal também será negativo, indicando não haver metástase linfática (KELLEY; HANSEN; MCMASTERS, 2004; SAKORAFAS; PEROS, 2007).

Técnicas para ajudar a localizar qual é o linfonodo sentinela em uma cadeia mamária são descritas e a técnica da coloração do mesmo com corante Azul Patente (AP) tem sido utilizada em mulheres e, mais recentemente, em cadelas; porém ainda é uma técnica muito pouco utilizada na rotina cirúrgica de animais de companhia (PINHEIRO et al., 2003; SAKORAFAS; PEROS, 2007). A excisão da neoplasia mamária seguida da excisão do(s) linfonodo(s) sentinela (s) faz-se útil por diminuir as complicações intra e pós-operatórias das mastectomias tradicionais, assim como permitir o diagnóstico precoce de micrometástases pela histopatologia (GIULIANO et al., 2011).

O linfonodo sentinela da neoplasia mamária é o primeiro sítio de metástase do tumor e a identificação de metástases no LS é importante como fator prognóstico visto que a metástase nodal é fator preditivo de recorrência e sobrevida em mulheres (RAHMAN; MOHAMMED, 2015). Em cadelas, a correlação do “status” nodal do LS com prognóstico e sobrevida ainda não foi bem estabelecida.

2.3 Angiogênese tumoral

Angiogênese tumoral resulta na formação de uma rede de novos vasos essencial para o crescimento e nutrição da neoplasia, que é incapaz de crescer sem a ocorrência deste evento (CARMELIET; JAIN, 2000). Além disso, a angiogênese tumoral também é essencial como via de metástase (BERGERS; BENJAMIN, 2003). Para que esse evento ocorra, são necessárias diferentes sinalizações, como estresse metabólico (hipóxia, hipoglicemia, etc.), estresse mecânico (compressão), mutação genética e resposta imune/inflamatória com a liberação de fatores pró-angiogênicos e

citocinas, além da diferenciação e proliferação de células progenitoras endoteliais (CARMELIET; JAIN, 2000; WANG et al., 2017). A angiogênese é um evento balanceado, portanto, por fatores angiogênicos e não angiogênicos, que controlam e permitem o crescimento de novos vasos (Figura 2) (HLATKY; HAHNFELDT; FOLKMAN, 2002).

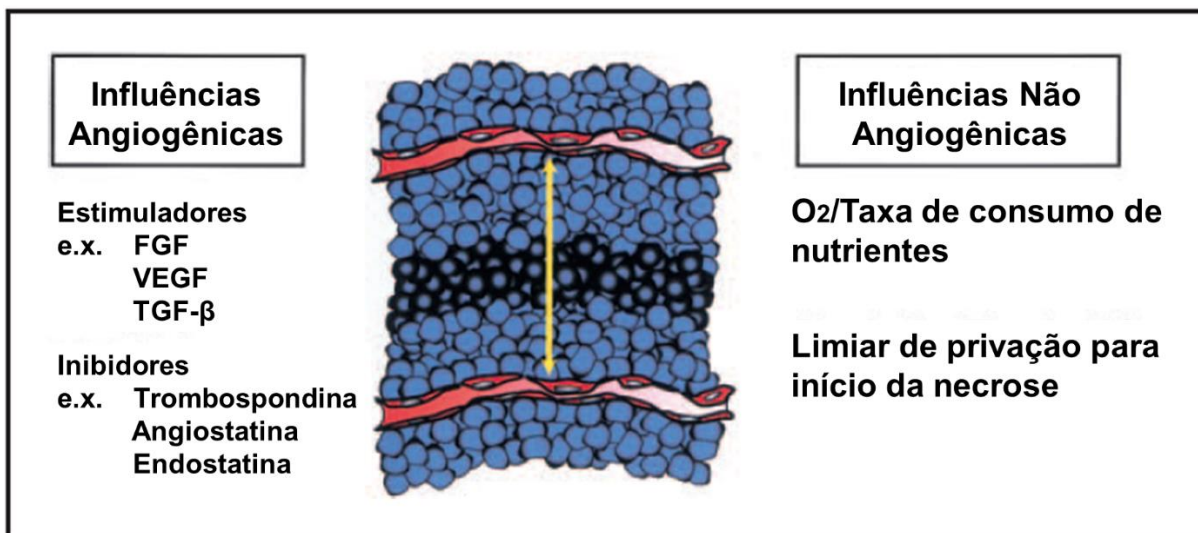
A quantificação da angiogênese pode ajudar a prever como a neoplasia irá progredir e sua resposta ao tratamento (GASPARINI; BIGANZOLI; BONOLDI, 2001; MARSON et al., 2001). A neoplasia mamária invasiva ou *in situ* expressa diversos fatores angiogênicos, incluindo o VEGF, que é uma glicoproteína produzida por células normais e neoplásicas e importante regulador de angiogênese fisiológica e patológica, sendo detectado em todos os estágios tumorais (COLLEONI et al., 2002; GIOVANINI et al., 2010; YAMASHITA-KASHIMA et al., 2012). A expressão tecidual de VEGF nas neoplasias mamárias malignas é aumentada e está relacionada com pior prognóstico e menor sobrevida em pacientes humanos (RODRIGUES et al., 2012; YAMASHITA-KASHIMA et al., 2012).

Outra forma de avaliar a angiogênese tumoral é pela detecção de ciclooxigenase-2 (COX-2), uma enzima que controla a conversão de ácido araquidônico à prostaglandina H₂ (DUBOIS et al., 1998). Foi demonstrada forte correlação entre expressão de COX-2 e VEGF em neoplasias mamárias caninas, além da relação de COX-2 e angiogênese tumoral (QUEIROGA et al., 2011). Além disso, a maior expressão de COX-2 tecidual está relacionada a um comportamento tumoral mais agressivo (QUEIROGA et al., 2011). A expressão de COX-2 foi relacionada também com metástases em linfonodos regionais de tumores de mama primários de cadelas (ARAÚJO et al., 2016).

A quantificação de alguns aspectos da vasculatura tumoral como a densidade microvascular (DMV) visa avaliar a eficácia da terapia antiangiogênica (ARNES et al., 2012). A DMV revela o grau da atividade angiogênica da neoplasia, o que pode ser usado como um marcador da eficácia dos agentes antiangiogênicos e também elege os pacientes que são candidatos à terapia antiangiogênica (BIESAGA et al., 2012; HLATKY; HAHNFELDT; FOLKMAN, 2002). A mensuração da DMV pode ser inversamente proporcional ao tempo de sobrevida de pacientes com neoplasias mamárias (MARTIN et al., 1997). Além disso, estudos pré-clínicos confirmaram que a angiogênese possui um papel central na carcinogênese do tumor de mama e no seu potencial metastático, pois a DMV é conhecida por ser preditiva de micrometástases

na medula óssea, recorrência e sobrevivência; estabelecendo a angiogênese como um potencial alvo terapêutico para tumores de mama (MACKEY et al., 2012).

Figura 2 – A densidade microvascular reflete a distância intercapilar. Este esquema de uma secção de tumor com dois vasos, ilustra a distância intercapilar (indicada pela seta amarela). Assim, a densidade microvascular, é influenciada por fatores angiogênicos e não angiogênicos.



FGF = Fator de crescimento de fibroblastos; VEGF = Fator de crescimento endotelial vascular; TGF- β = fator de crescimento transformador; O₂ = Oxigênio.

Fonte: adaptada de HLATKY; HAHNFELDT; FOLKMAN (2002).

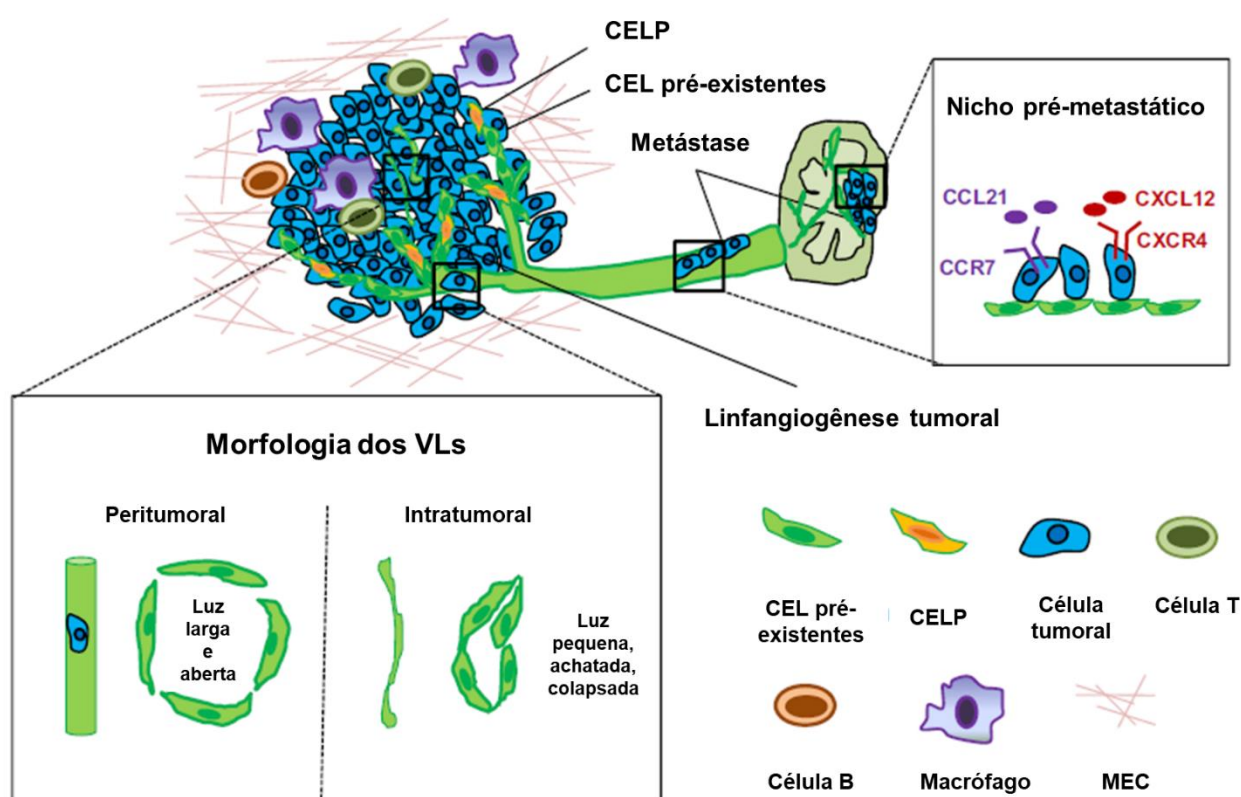
2.4 Linfangiogênese tumoral

Outro aspecto importante no desenvolvimento de neoplasias é a linfangiogênese, visto que o crescimento de novos vasos linfáticos, assim como de novos vasos sanguíneos, é essencial para o crescimento, invasão e metástase tumoral (SLEECKX et al., 2014b). Em humanos, a linfangiogênese é um fator prognóstico em potencial para as neoplasias mamárias, neoplasias colorretais, melanoma e câncer da cabeça e pescoço (NIEMIEC et al., 2017). Em especial, para as neoplasias mamárias, a linfangiogênese possui destaque já que este tipo de neoplasia costuma metastatizar via sistema linfático (CUNNICK et al., 2002).

É caracterizada por ser um processo complexo de interatividade entre fatores linfangiogênicos que estimulam o crescimento de novos vasos a partir de células endoteliais e de células endoteliais progenitoras (HU; LUO, 2018). Os vasos linfáticos (VL) possuem uma heterogeneidade caracterizada por vasos peritumorais (PT) largos e com ampla luz, que contribuem para a metástase tumoral; enquanto que os vasos

intratumorais (IT) são pequenos e colapsados, sendo considerados não funcionais como via de metástase (Figura 3) (HU; LUO, 2018).

Figura 3 – Heterogeneidade dos vasos linfáticos (VLs) associados ao tumor. Linfangiogênese induzida pelas interações entre células tumorais, macrófagos, células B, células T e matriz extracelular (MEC). A linfangiogênese tumoral ocorre principalmente via brotamento de células endoteliais linfáticas (CEL) pré-existentes e, em alguns casos, células endoteliais linfáticas progenitoras (CELP). Além disso, o aumento dos VLs induzido por tumor e a linfangiogênese no linfonodo (nicho “pré-metastático”) promovem a metástase tumoral.



Fonte: adaptada de HUO e LUO (2018).

A linfangiogênese tem sido mensurada de diferentes formas em um tecido, podendo ser obtida a densidade de vasos linfáticos (DVL). Para obtenção da DVL e posterior correlação com prognóstico, são utilizados marcadores específicos de células endoteliais linfáticas como o receptor do fator de crescimento endotelial vascular-3 (VEGFR-3), podoplanina, LYVE -1, D2-40 e Prox-1 (ABE et al., 2016; SLEECKX et al., 2014b). A proteína prox-1 tem mostrado ser o marcador mais sensível e específico da DVL em cães, já que o marcador D2-40, mais utilizado como

marcador de vasos linfáticos em humanos, não demonstrou imunorreatividade em tecidos caninos (SLEECKX et al., 2013).

Na mulher com câncer de mama, a alta contagem na DVL foi fortemente correlacionada com sobrevida e fatores clínico-patológicos como metástase em linfonodo sentinela, invasão linfovascular por células tumorais, pré-menopausa, positividade para receptores de estrógeno e pior prognóstico (ABE et al., 2016; ZHANG et al., 2017). Em uma metanálise sobre vasos linfáticos em neoplasias mamárias na mulher foi demonstrado que altos valores de DVL e a presença de invasão linfovascular são os principais fatores prognósticos negativos (ZHANG et al., 2017).

Em cadelas com neoplasia mamária, Sleeckx et al. (2014b) estudaram a linfangiogênese e observaram que a maioria dos achados está de acordo com aqueles demonstrados em humanos, o que ressalta a importância dos caninos como modelos experimentais para a neoplasia em humanos. Porém, não foi demonstrada correlação da linfangiogênese com sobrevida na espécie, necessitando-se de mais estudos para estabelecimento ou não dessa correlação (SLEECKX et al., 2014b).

2.5 Terapia da neoplasia mamária canina

A terapia para a neoplasia mamária de cães ainda é um desafio e existem diversos procedimentos terapêuticos atualmente empregados e com diferentes resultados, mas que não necessariamente levam à cura do paciente. A cirurgia continua a ser a técnica de escolha para as cadelas com tumores mamários, com exceção daquelas com carcinoma inflamatório (MISDORP, 2002). Cadelas com NMC benignas e 50% das cadelas com NMC maligna serão curadas apenas com a excisão cirúrgica (STRAW, 2005). Porém, os outros 50% com tumores malignos já apresentam micro-metástases no momento do ato cirúrgico, o que eventualmente, levará a paciente a óbito (MISDORP, 2002). Estas pacientes, portanto, poderão ser beneficiadas no aumento de sua sobrevida com o uso terapias sistêmicas como a quimioterapia adjuvante.

A quimioterapia citotóxica convencional tem como mecanismo de ação destruir as células tumorais ou inibir sua proliferação agindo nas células em mitose (BROWDER et al., 2000). Browder et al (2000) destacaram o fato de que alguns quimioterápicos além desses mecanismos de ação, também agem por um mecanismo

secundário por inibição da angiogênese tumoral. Os efeitos antiangiogênicos de alguns quimioterápicos como a ciclofosfamida, podem ser anulados devido aos longos intervalos de tempo entre os ciclos tradicionais que utilizam a dose máxima tolerável (DMT) (BROWDER et al., 2000). Além disso, se a toxicidade é esperada, os ciclos de quimioterapia com DMT requerem um intervalo entre aplicações de duração suficiente para permitir que os tecidos normais susceptíveis aos fármacos, como o epitélio intestinal e a medula óssea, se recuperem antes da próxima aplicação (MUTSAERS, 2009).

A quimioterapia com uso de DMT, por uma perspectiva antiangiogênica, possui como um ponto negativo o fato de que o intervalo de tempo entre os ciclos permite ao componente endotelial do tumor uma oportunidade de reparo a alguns dos danos provocados pela antiangiogênese do quimioterápico (KLEMENT et al., 2000; MUTSAERS, 2009).

Uma estratégia para otimizar os efeitos antiangiogênicos da quimioterapia é a utilização contínua de alguns fármacos em um esquema de administração frequente e em doses muito mais baixas do que as DMTs, retirando-se os longos intervalos entre ciclos (BROWDER et al., 2000). Este conceito de tratamento tem sido referido como quimioterapia contínua em baixa dose, quimioterapia antiangiogênica ou quimioterapia metronômica (QM) (MUTSAERS, 2009).

A quimioterapia metronômica controla a resistência aos quimioterápicos, exibe sinergismo quando combinada com agentes antiangiogênicos e controla o crescimento tumoral, por inibição das células endoteliais e das células progenitoras endoteliais circulantes (BERTOLINI; PAUL; MANCUSO, 2003; BILLER, 2014).

Em humanos, a QM tem sido mais utilizada nos últimos 10 anos para tratamento de tumores de mama, de próstata, de ovário, mielomas múltiplos e melanomas (HARPER; BLACKWOOD, 2017). Dessa forma, o baixo-custo, a comodidade e os aceitáveis efeitos adversos destes protocolos, a faz atrativa para uso veterinário (CHAN et al., 2016; MUTSAERS, 2009). Apesar disso, a literatura traz poucos resultados com o uso da QM em medicina veterinária, sendo a maior parte dos estudos em sarcomas de tecidos moles (BURTON et al., 2011; CANCEDDA et al., 2016; ELMSLIE et al., 2008). Em relação às neoplasias mamárias caninas, foi demonstrado efeito pró-apoptótico após tratamento com quimioterapia metronômica, sugerindo um efeito benéfico da terapia (MENDES et al., 2016). Ainda em cadelas com tumores de mama, o tratamento pós-cirúrgico concomitante com QM e talidomida

demonstrou maior sobrevida quando comparado aos animais tratados somente com cirurgia (CAMPOS et al., 2018).

Em relação aos efeitos da terapêutica oncológica na inibição da linfangiogênese, foi levantada a hipótese de que a inibição dos fatores que estimulam a linfangiogênese, como o VEGF, pode auxiliar na redução da invasão de células tumorais em vasos linfáticos e que mais estudos sobre a terapia alvo antilinfangiogênica podem beneficiar o tratamento oncológico (STACKER; ACHEN, 2008).

3 OBJETIVOS

Objetivos Gerais

- Avaliar os efeitos da quimioterapia metronômica na angiogênese e linfangiogênese de neoplasias malignas de glândula mamária de cadelas;
- Estabelecer o significado clínico-patológico da densidade de vasos linfáticos nas neoplasias mamárias caninas, correlacionando-a com outros fatores prognósticos;

Objetivos Específicos

- Avaliar a eficácia da terapia, através de acompanhamento clínico das cadelas durante a mesma;
- Pesquisar a relevância dos linfonodos sentinelas em neoplasias mamárias malignas de cadelas através da técnica da biópsia do linfonodo sentinela;
- Comparar as neoplasias tratadas somente com mastectomia e neoplasias tratadas com quimioterapia metronômica e mastectomia; em relação à densidade microvascular, densidade de vasos linfáticos, expressão de VEGF tecidual, expressão de COX-2 tecidual, índice de proliferação celular (Ki67) e índice apoptótico (caspase-3) de células tumorais.

4 HIPÓTESES

- A angiogênese e a linfangiogênese tumoral são importantes para o crescimento e progressão tumoral;
- A quimioterapia metronômica possui capacidade de diminuir a angiogênese e a linfangiogênese tumoral em tumores de mama caninos;
- Pesquisar o “status” do linfonodo sentinela na neoplasia mamária é de suma importância para estabelecimento de terapia e prognóstico;
- A densidade de vasos linfáticos pode ser correlacionada com aspectos clínico-patológicos e aos fatores prognósticos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

A execução desta pesquisa foi aprovada pela CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da Unesp, campus Araçatuba/SP sob o processo FOA nº 00722-2016.

Foram utilizadas quarenta (n=40) cadelas com neoplasias mamárias malignas previamente diagnosticadas por punção aspirativa por agulha fina e análise citológica (SOLANO-GALLEGO; MASSERDOTTI, 2016). A avaliação clínico-laboratorial desses animais foi baseada em hemograma completo, bioquímica sérica (ureia, creatinina, ALT, fosfatase alcalina, proteína total, albumina e cálcio), radiografias torácicas e ultrassonografia abdominal. Todos os animais foram estadiados clinicamente pelo sistema TNM de estadiamento clínico para tumores mamários caninos (OWEN, 1980) (Tabela 2). Foram excluídas desta pesquisa cadelas com doença renal crônica, doença hepática, endocrinopatias, portadoras de carcinoma inflamatório mamário e que foram tratadas com quimioterapia e/ou anti-inflamatórios (esteroidais ou não esteroidais) nos últimos sessenta (60) dias.

5.2 Características clínicas

Foram pesquisados os fatores predisponentes às neoplasias e as características tumorais das pacientes portadoras de NMC. A pesquisa incluiu a resenha, anamnese completa e exame físico específico das glândulas mamárias, conforme ficha clínica de tumores de mama em cadelas (Apêndice A), que contempla o histórico reprodutivo das cadelas, como realização de OSH, uso de anticoncepcionais e ocorrência de pseudociese prévia à neoplasia. Como características tumorais, foram compiladas as informações quanto ao tempo de crescimento da neoplasia, sendo este considerado lento (>6 meses) ou rápido (<6 meses); aderência da neoplasia na musculatura; e tamanho (<3cm ou ≥3cm), para o maior nódulo, em casos de múltiplos nódulos na cadeia mamária.

5.3 Grupos

Os animais portadores de neoplasia mamária foram divididos em dois grupos. O grupo mastectomia (GM) (n=20) foi submetido ao tratamento cirúrgico, consistindo

em mastectomia em cadeia unilateral ou bilateral. O grupo quimioterapia (GQ) (n=20) foi submetida à quimioterapia metronômica seguida do mesmo tratamento cirúrgico do GM. As cirurgias ocorreram de 1 a 7 dias após o fim da quimioterapia. As cadelas do grupo GQ passaram por reavaliação clínica semanal durante a quimioterapia, incluindo mensuração da(s) neoplasia(s) por paquímetro digital e avaliação hematológica e bioquímica semanal. Um terceiro grupo controle (GC, n= 8) foi composto por cadeias bilaterais de glândulas mamárias removidas durante exame necroscópico, no setor de Patologia Animal da FMVA – UNESP/SP e no setor de Patologia Animal do UniSalesiano – Araçatuba/SP, de cadelas adultas submetidas à eutanásia por diferentes causas, porém sem sinais de neoplasia mamária ou de qualquer alteração macroscópica nas glândulas mamárias.

5.4 Quimioterapia metronômica (QM)

No GQ foi realizada quimioterapia metronômica com ciclofosfamida na dose 15mg/m² (BURTON et al., 2011) por via oral, uma vez ao dia associada ao piroxicam na dose 0.3mg/kg por via oral, uma vez ao dia (ELMSLIE et al., 2008). Os animais foram também medicados com o protetor de mucosa gástrica omeprazol 0,7mg/kg por via oral, uma vez ao dia. A QM teve duração total de 28 dias. A toxicidade aos quimioterápicos foi graduada de acordo com os Critérios de Comum Terminologia para Efeitos Adversos do Grupo de Oncologia Veterinária (VCOG, 2016), onde altos escores implicaram em uma pior qualidade de vida.

5.5 Cirurgia

Para a realização do procedimento cirúrgico, todas as cadelas dos GM e GQ foram submetidas à anestesia geral inalatória, após prévia medicação pré-anestésica e analgesia. O tratamento cirúrgico consistiu em mastectomia unilateral ou bilateral padrão para ressecção cirúrgica das mamas, nódulos e linfonodos, segundo técnica descrita por MacPhail (2014). No pós-operatório imediato, as cadelas foram monitoradas até completa recuperação e estabilização dos parâmetros vitais. Como medicação pós-operatória, as cadelas receberam amoxicilina com clavulanato de potássio na dose de 20mg/kg, por via oral, a cada 12 horas, durante 10 dias; cloridrato de tramadol na dose de 4mg/kg, por via oral, a cada 8 horas, durante 5 dias; dipirona 25mg/kg, por via oral, a cada 8 horas, durante 5 dias; e meloxicam 0,1mg/kg por via

oral, a cada 24 horas, durante 3 dias. Receberam, ainda, ranitidina 2mg/kg, por via oral, a cada 12 horas, durante 10 dias, como protetor de mucosa gástrica.

5.6 Técnica da biópsia do linfonodo sentinela (BLS)

A detecção e ressecção do linfonodo sentinela para posterior avaliação do seu “status” nodal foi realizada pela técnica da BLS. Imediatamente antes do procedimento cirúrgico, mas com os animais já sob anestesia geral, foram palpadas e localizadas as neoplasias mamárias e, no caso de múltiplas mamas acometidas por tumores, a técnica da biópsia do linfonodo sentinela foi aplicada ao tumor de maior diâmetro. Após antissepsia com clorexidina degermante e clorexidina alcoólico, o tumor selecionado foi virtualmente dividido em quatro quadrantes iguais. Seguiu-se a inoculação na região peri-tumoral, de cada quadrante, um quarto do volume total de Azul Patente V 2,5% (Guerbert®) considerado para cada neoformação mamária.

A dose estabelecida do corante foi de 2 mg/Kg de Azul Patente 2,5% por via intradérmica (BESERRA, 2014; PINHEIRO et al., 2003). Após 10 minutos, foi observada a migração do contraste pela via linfática. As vias de drenagem linfática de cada tumor foram identificadas por inspeção visual da pele, caracterizadas por marcação azulada dos vasos linfáticos superficiais. Seguindo-se o trajeto linfático, foi identificado o sítio anatômico “drenante” correspondente à localização do(s) linfonodo(s) sentinela(s). O sítio marcado foi submetido, então, à incisão simples e identificação direta do LS marcado em azul, seguida de linfadenectomia. Na sequência, foi realizada mastectomia. No caso de o LS ser um linfonodo inguinal, este foi removido em conjunto com a mastectomia em um único ato cirúrgico.

5.7 Histopatologia

As neoplasias mamárias, assim como os tecidos mamários sem alterações macroscópicas, foram clivadas e fixadas em formol tamponado e processadas segundo os métodos de inclusão em parafina. Os linfonodos regionais e o linfonodo sentinela foram cortados, segundo método para detecção de micrometástases preconizado por Weaver (2010). Na sequência, foram feitos cortes de 4µm de espessura, sendo, então, corados com hematoxilina-eosina (LUNA, 1968) e examinados ao microscópio de luz. As neoplasias mamárias foram classificadas e graduadas segundo Cassali et al. (2014), sendo os carcinomas os de interesse na

pesquisa. Pela histopatologia, foram avaliados e comparados os grupos quanto à classificação e graduação histológica.

5.8 Imuno-histoquímica

5.8.1 COX-2, VEGF, Ki67 e Caspase-3

As reações de imuno-histoquímica empregadas seguiram o protocolo do Laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), Unesp de Araçatuba e foram realizadas neste mesmo estabelecimento.

Foi realizada imuno-histoquímica para a expressão de COX-2, VEGF, Ki67 e Caspase-3 nos tecidos mamários neoplásicos, previamente fixados em formol tamponado a 10% e incluídos em parafina. Para todas as reações de imuno-histoquímica, foi utilizado o sistema de detecção polímero HRP EnVision™ FLEX (Dako Denmark, Glostrup, Dinamarca), segundo as recomendações do fabricante.

Para detecção de COX-2, foi utilizado o anticorpo monoclonal clone CX-294. O número de células positivas para COX-2, assim como a intensidade de marcação, foi avaliado por escore, segundo descrito por Lavallo et al. (2009). Para imunomarcagem de VEGF tecidual, foi utilizado o anticorpo anti-VEGFA (clone VG-1) e graduação do mesmo, segundo Maae et al. (2011). Para obtenção do índice apoptótico (IA), as células tumorais em apoptose foram detectadas através de imunomarcagem usando o anticorpo anti-caspase-3 conforme preconizado por Lipponen (1999). A detecção do índice de proliferação (IP) das células neoplásicas foi realizada pelo anticorpo anti-Ki67 segundo Dowsett et al. (2011).

5.8.2 Densidade microvascular (DMV)

Os grupos mastectomia e quimioterapia passaram por avaliação da DMV. Inicialmente, realizou-se imuno-histoquímica usando anticorpo monoclonal anti-CD31 (Clone JC70A), aplicando-se o mesmo sistema de detecção comercial anteriormente citado. Após, a DMV foi obtida segundo cálculo descrito por Martin et al. (1997).

5.8.3 Densidade de vasos linfáticos (DVL)

A DVL dos tecidos mamários de todos os grupos foi obtida após imunomarcacão com o anticorpo monoclonal de coelho anti-prox-1, segundo técnica e cálculo descritos por Sleenckx et al. (2014b). Para os grupos GM e GQ, foi obtida a DVL intratumoral (IT), peritumoral (PT) e total. Para o GC, a DVL obtida foi a total, devido à ausência de tecido neoplásico.

5.8.4 Metástase nodal

As metástases nodais dos carcinomas mamários foram detectadas por imunomarcacão com citoqueratina com o anticorpo AE1/AE3. O sumário de todas as reações imuno-histoquímicas está descrito na Tabela 3.

Tabela 3- Sumário dos protocolos imuno-histoquímicos

	Controle positivo	Células alvo	Ac Primário	Diluição	Recuperação antigênica
CD31	Hemangiossarcoma	Células endoteliais sanguíneas	Monoclonal de camundongo JC70 (Abcam)	1:20	Tampão Citrato pH 6.0 (micro-ondas)
Prox-1	Linfonodo	Células endoteliais linfáticas	Monoclonal de coelho (Abcam)	1:500	Tampão Tris-Edta Tween 20 pH 9.0 (panela de pressão)
Ki67	Linfonodo	Células em proliferação	Policlonal de coelho (Abcam)	1:100	Tampão Citrato pH 6.0 (panela de pressão)
VEGFA	Hemangiossarcoma	Células neoplásicas, células endoteliais ¹	Monoclonal de camundongo VG-1 (Abcam)	1:150	Tampão Citrato pH 6.0 (micro-ondas)
Caspase-3	Tonsila	Células em apoptose	Policlonal de coelho (Abcam)	1:50	Tampão Tris-Edta Tween 20 pH 9.0 (micro-ondas)
COX-2	Pneumonia granulomatosa	Células neoplásicas	Monoclonal de camundongo CX-294 (Dako)	1:80	Tampão Citrato pH 6.0 (micro-ondas)
Citoqueratina	Carcinoma mamário	Células epiteliais metastáticas	Monoclonal de camundongo AE1/AE3 (Dako)	1:300	Tampão Citrato pH 6.0 (micro-ondas)

¹marcação também de macrófagos.

Fonte: elaborada pela Autora.

5.9 Acompanhamento e sobrevida

Os animais pertencentes aos grupos GM e GQ foram acompanhados clinicamente por um período de 4 anos, sendo realizadas reavaliações a cada 6 meses, incluindo exames de imagem (radiografia torácica e ultrassonografia abdominal) para pesquisa de metástase, sendo documentadas as causas de óbito. As curvas das sobrevidas totais dos animais foram obtidas e comparadas entre os grupos. Os óbitos de causa desconhecida ou não relacionados ao tumor foram ocultados da análise.

5.10 Análise estatística

Para análise da DMV e IP entre os grupos utilizou-se o teste t de Student para amostras paramétricas. Foi utilizado o teste Mann-Whitney para amostras não paramétricas para análise do IA entre os grupos. A relação da DVL (IT e PT) das mamas com neoplasias mamárias do grupo mastectomia com os parâmetros clínico-patológicos foi realizada para as variáveis não paramétricas com o teste Mann-Whitney e para as variáveis paramétricas com o teste t de Student. A correlação da DVL (IT e PT) entre os grupos (GC, GM e GQ) foi realizada com o teste Kruskal-Wallis. As correlações da DVL (IT e PT) com a DMV, IP, IA, escore de COX-2 e sobrevida foram testadas pelo coeficiente de correlação de Spearman, assim como as correlações DMV com IP, escore de COX-2 e grau de VEGF. As curvas de análise das sobrevidas totais dos grupos GM e GQ foram obtidas utilizando o método Kaplan-Meier e comparadas pelo teste log-rank (Mantel-Cox). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Graphpad Prism versão 6.0. com nível de significância $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Características clínicas

A idade média das fêmeas participantes do estudo foi 9,6 anos ($(\pm 2,40)$) e as sem raça definida foram as mais prevalentes no estudo (31,5%), seguidas da raça Poodle (18,4%). As características tumorais foram diversas sendo que 75,7% das neoplasias eram pedunculadas e apenas 24,3% aderidas; 57,9% possuíam diâmetro inferior a 3,0cm, 10,5% entre 3,0 e 5,0cm e 31,6% maiores que 5,0cm.

Em relação às variáveis que predispõem à ocorrência de neoplasia mamária, 51,35% das cadelas tinham histórico de pseudocirose, 24,3% tinham histórico de terem recebido anticoncepcionais para inibição do estro e 83,8% das cadelas não eram ovário-histerectomizadas.

A maioria das NMC apresentou crescimento lento (76,3%) e, os demais, histórico de crescimento rápido, conforme referido pelo tutor durante anamnese. Sobre o estadiamento clínico TNM, 40% das cadelas estavam no estadio I, 8% estadio II, 27,5% estadio III, 21,5% estadio IV e 3% estadio V com metástase pulmonar.

6.2 Efeitos adversos da quimioterapia metronômica

Os efeitos adversos observados durante o período de tratamento com QM, estão representados na Tabela 4. Nota-se a ausência de efeitos colaterais de escore 2 a 5 e a presença frequente de êmese escore 1 que perdurava em torno de 3 dias após o início da terapia com resolução espontânea, sem intervenção terapêutica.

6.3 Aplicabilidade e sensibilidade da técnica de biopsia de linfonodo sentinela

A técnica foi aplicada em 20 animais no total, sendo 10 animais de cada grupo do estudo. Nos animais em que foi preconizada a realização da técnica da biopsia do linfonodo sentinela (Figura 4A e 4B), foi observado que em 88,8% dos casos, os linfonodos sentinelas foram identificados de forma nítida por estarem corados em azul, associado à evidente marcação de todo o trajeto da drenagem linfática correspondente (Figura 5A). Em apenas 1 caso (11,1%) não foi identificado o linfonodo sentinela após a aplicação peritumoral do corante AP.

Tabela 4- Alterações clínicas e laboratoriais referentes à toxicidade observada nos pacientes do Grupo Quimioterapia

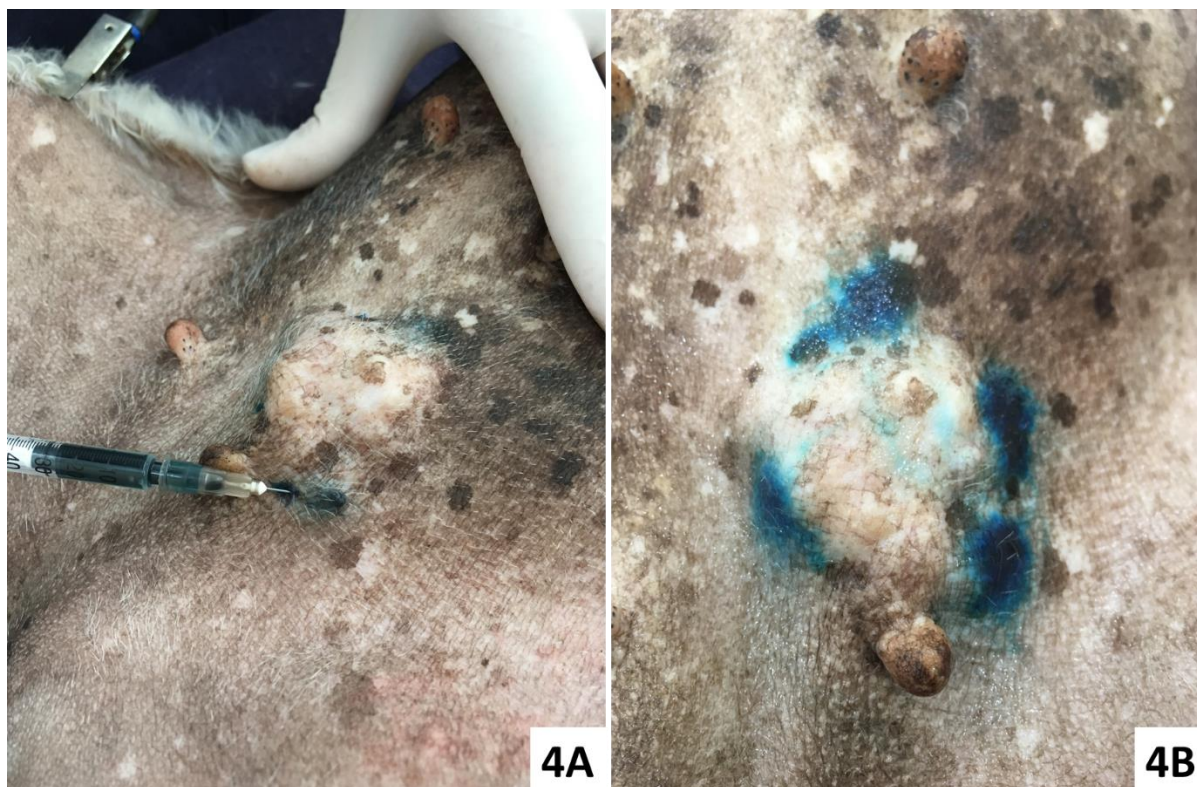
Toxicidade	0	1	2	3	4	5
Êmese	8	12	0	0	0	0
Diarreia	18	2	0	0	0	0
Alopecia	18	2	0	0	0	0
Leucopenia	17	3	0	0	0	0
Uremia	19	1	0	0	0	0
Elevação ALT	19	0	1*	0	0	0
Elevação FA	19	1*	0	0	0	0
Trombocitopenia	19	1	0	0	0	0

0: não ocorreu; 1: mínimos efeitos, sem necessidade de intervenção; 2: moderados efeitos, com intervenção não invasiva; 3: severos efeitos, com necessidade de hospitalização; 4: risco de vida; 5: morte devido ao efeito adverso.

* tratamento com silimarina (30mg/kg), via oral, uma vez ao dia durante 60 dias.

Fonte: elaborada pela Autora.

Figura 4 – Técnica da biópsia do linfonodo sentinela. (A) – Aplicação intradérmica do corante azul patente V (2,5%) com agulha hipodérmica. (B) – Nota-se que a lesão foi dividida subjetivamente em quatro quadrantes para aplicação do corante.



Fonte: elaborada pela Autora.

Os linfonodos marcados pelo corante foram, em sua maioria, os linfonodos inguinais superficiais e profundos bilaterais, independentemente de ser a cadeia mamária direita ou esquerda afetada pela neoplasia (77,7%) (Figura 5B). Nestes casos, todas as neoplasias localizavam-se nas mamas abdominais ou inguinais direita ou esquerda. Em um caso, o carcinoma encontrava-se na mama torácica cranial, sendo identificada marcação do linfonodo axilar ipsilateral e, em um caso de neoplasia em mama inguinal, foram identificados, além dos linfonodos inguinais, também o linfonodo poplíteo ipsilateral, como sentinelas.

Não foram observadas reações adversas pela aplicação do corante AP em qualquer caso. Em todos os animais foi observada a excreção renal e gastrointestinal do corante dentro de um período que variou de 1 a 3 dias de pós-operatório imediato, o que provocou característica coloração azulada das fezes e urina durante o período supracitado.

Figura 5 – Técnica da biópsia do linfonodo sentinela. (A) – Visualização dos vasos linfáticos demarcados pelo corante azul patente V indicando a localização do linfonodo sentinela na região axilar esquerda. (B) – Evidenciação de marcação bilateral de vasos linfáticos pelo corante aplicado em uma neoplasia em mama inguinal esquerda (asterisco), indicando a área drenante pelos linfonodos sentinelas.

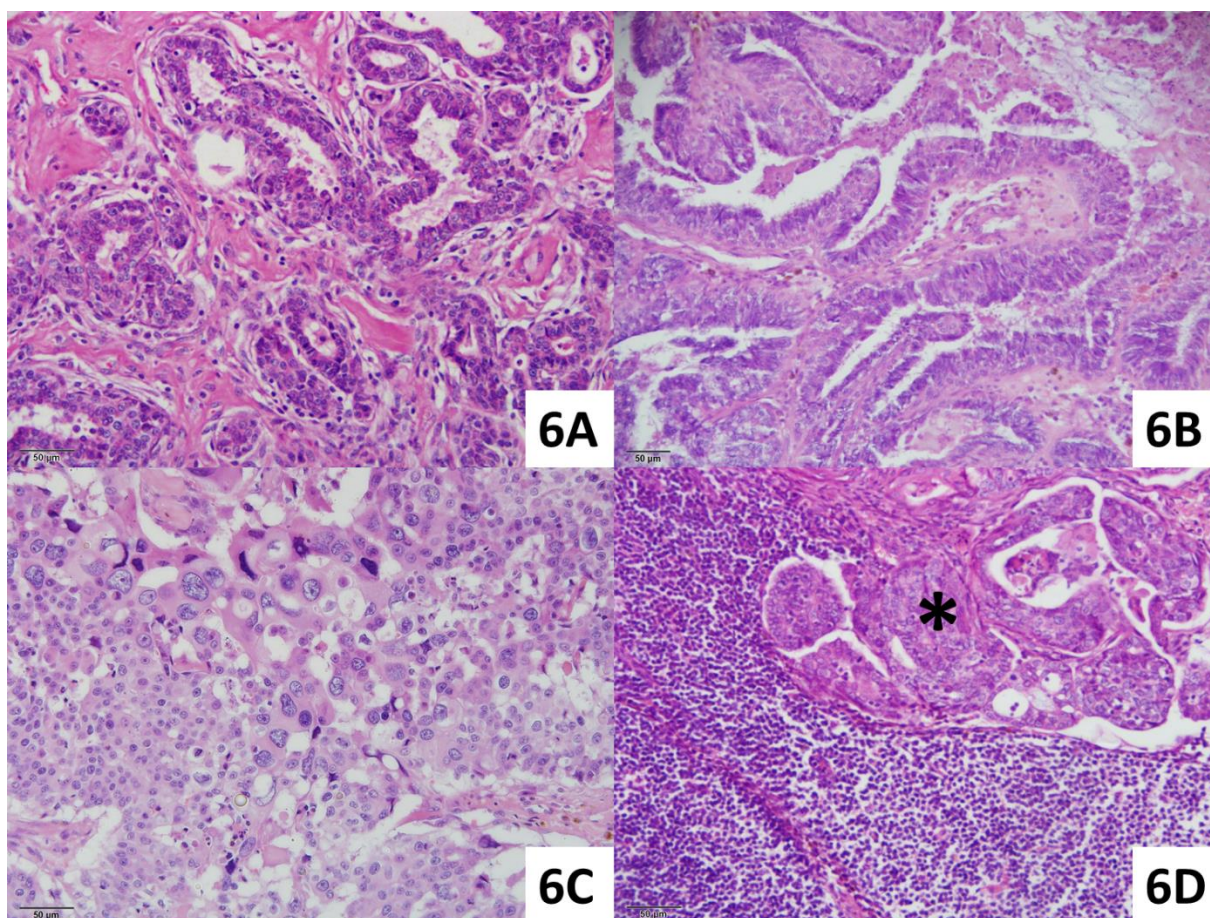


Fonte: elaborada pela Autora.

6.4 Histopatologia

A totalidade das neoplasias mamárias foi diagnosticada como maligna, sendo a maioria (52.6%, n=22) classificada como carcinomas tubulares. As demais obtiveram classificação diversa, sendo 15.8% carcinoma papilar invasivo; 13.2% carcinoma em tumor misto; 5.3% carcinoma complexo; 5.3% carcinoma de células escamosas; e os carcinomas lobular, sólido e micropapilar obtiveram 2.6% de representatividade cada (Figura 6). Os tumores classificados histologicamente (CASSALI et al., 2014) no grau I foram os mais frequentes (50%), seguidos dos tumores de grau II (39.5%) e os de grau III (10.5%).

Figura 6 – Fotomicroscopia das neoplasias mamárias (20x, HE). (A) – Carcinoma mamário tubular de grau I. (B) – Carcinoma papilar invasivo de grau I. (C) – Carcinoma mamário de células escamosas de grau III caracterizado por alto pleomorfismo, moderado índice mitótico e queratinócitos atípicos. (D) – Linfonodo sentinela de neoplasia mamária apresentando área de metástase (asterisco).

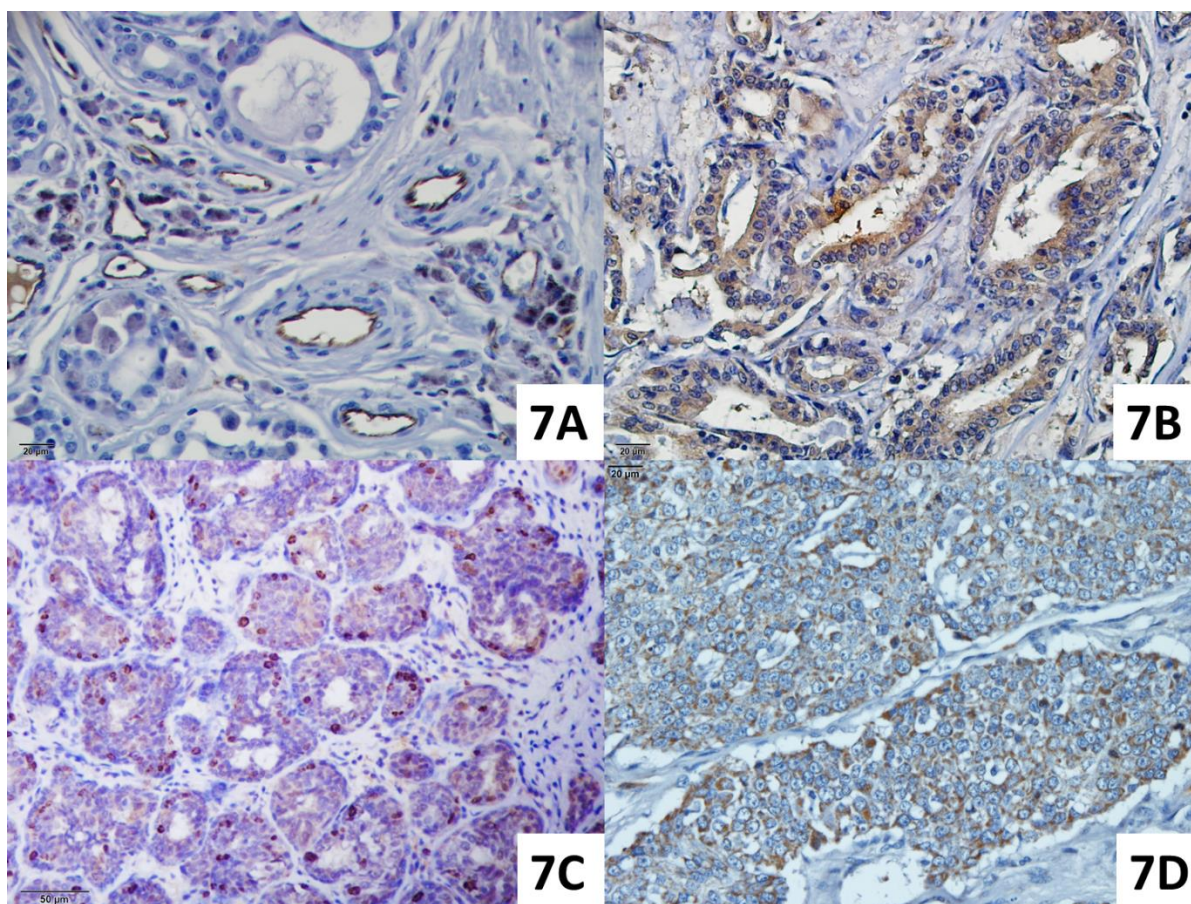


Fonte: elaborada pela Autora.

6.5 Imuno-histoquímica

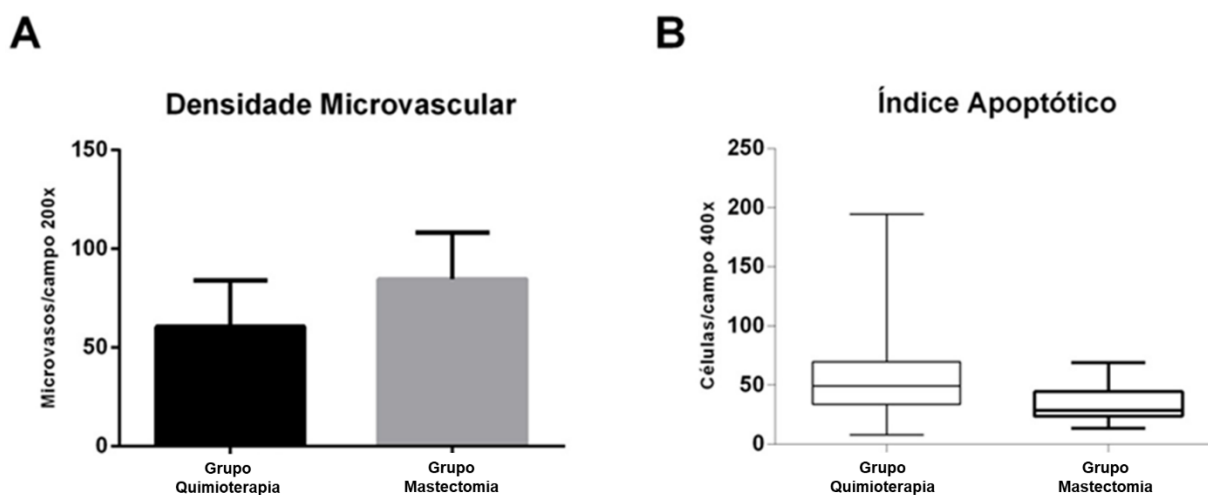
No que se refere aos aspectos angiogênicos das neoplasias, não houve correlação estatística entre DMV e VEGF, assim como não houve correlação estatística entre DMV e índice de proliferação celular (Ki67) (Figura 7). Foi observada correlação estatística entre a DMV e o escore de marcação para COX-2, somente do grupo tratado com quimioterapia, sendo que quanto maior o escore de COX-2, maior a DMV ($p=0,03$). Não foi observada correlação estatística entre escore de COX-2 e VEGF; e entre COX-2 e graduação histopatológica. No grupo tratado com quimioterapia (GQ) houve redução significativa ($p=0,01$) na DMV quando comparado ao grupo mastectomia (Figura 8). Ainda no GQ, houve aumento no índice apoptótico em comparação com o GM ($p=0,04$) (Figura 8).

Figura 7 – Fotomicroscopia das reações imuno-histoquímicas (DAB/Hematoxilina). (A) – Imunomarcção positiva para CD31 evidenciando microvasos em carcinoma mamário (40x). (B) – Carcinoma mamário com grau II de imunomarcção para VEGF (40x). (C) – Células neoplásicas em proliferação apresentando marcação nuclear por Ki67 (20x). (D) – Carcinoma mamário com alto escore de imunomarcção para COX-2 (40x).



Fonte: elaborada pela Autora.

Figura 8 – Diferença entre densidade microvascular (DMV) e índice apoptótico (IA) dos carcinomas mamários entre os grupos. (A) – Observa-se diferença ($p < 0,05$) na DMV entre os grupos, teste T de Student. (B) – IA com diferença estatística entre os grupos, teste Mann-Whitney ($p < 0,05$).

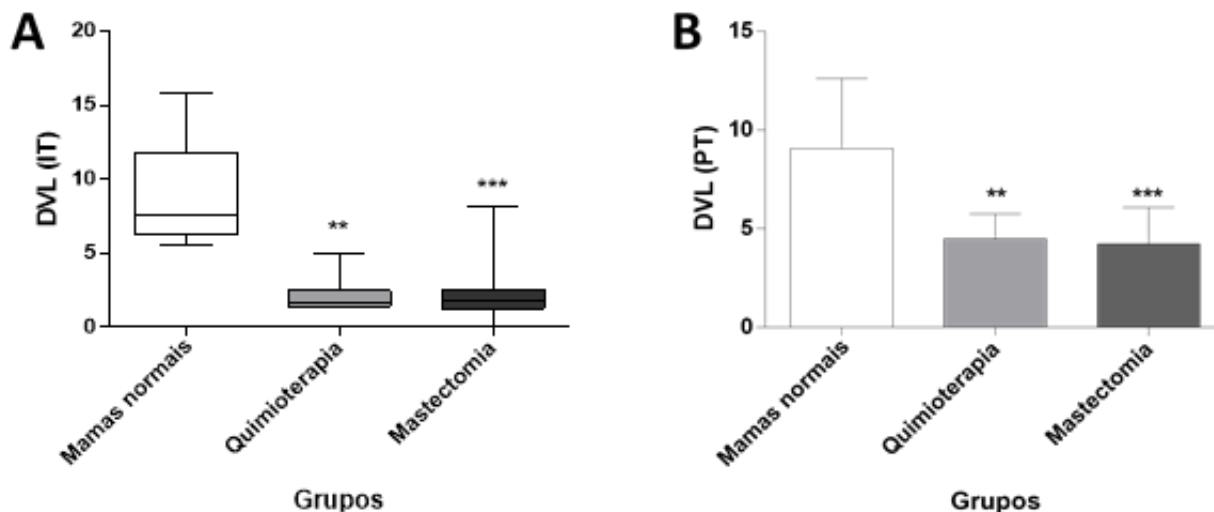


Fonte: elaborada pela Autora.

A DVL apresentou diferença estatística tanto intratumoral ($p=0,0002$) quanto peritumoral ($p=0,0007$) em relação ao grupo controle, porém sem diferença entre os grupos mastectomia e quimioterapia, considerando-se $p < 0,05$ (Figuras 9 e 10). A DVL se manteve maior no grupo controle, com média de $9,0 \pm 3,53$ microvasos/campo 400x. A média da DVL intratumoral no grupo mastectomia foi de $2,31 \pm 2,20$ microvasos/campo 400x e a da DVL peritumoral no mesmo grupo foi de $4,23 \pm 1,85$ microvasos/campo 400x. No grupo quimioterapia, a média da DVL intratumoral foi de $2,11 \pm 1,00$ microvasos/campo 400x e da DVL peritumoral foi de $4,49 \pm 1,26$ microvasos/campo 400x.

No que tange à linfangiogênese, houve correlação ($p=0,01$) entre a DVL IT e o IP (Ki67) (Figura 11), não havendo a mesma correlação entre DVL PT e DVL total. Não houve correlação da DVL (IT e PT) com a DMV (CD31); com o índice apoptótico; com escore de COX-2; e com sobrevida. Houve associação ($p=0,04$) entre a DVL IT e Total e a graduação do VEGF não havendo a mesma associação em relação à DVL PT. Da mesma maneira, houve associação ($p=0,04$) entre a DVL IT e a metástase em linfonodo sentinela, não havendo a mesma associação com DVL PT e Total. As associações entre as variáveis clínico-patológicas e as DVLs (IT e PT) do grupo mastectomia estão discriminadas na Tabela 5.

Figura 9 – Correlação entre as Densidades de Vasos Linfáticos (DVL) entre os grupos. (A) – Correlação entre a DVL intratumoral (IT) entre os grupos. (B) – Correlação entre a DVL peritumoral (PT) entre os grupos. Teste Kruskal-Wallis ($p < 0,01$).



** mamas normais (grupo controle) x grupo quimioterapia.

*** mamas normais (grupo controle) x grupo mastectomia.

Fonte: elaborada pela Autora.

Em relação à imunomarcagem da metástase nodal em linfonodo sentinela para o anticorpo anti-citoqueratina, 23.7% (n=9) dos animais apresentaram positividade. Os carcinomas papilares invasivos e os tubulares foram os que apresentaram maior positividade para metástase nodal, representando 33.3% cada, seguidos do carcinoma de células escamosas (22.2%). Dos carcinomas de células escamosas incluídos na pesquisa, 100% apresentaram metástase nodal, assim como para o carcinoma sólido. Já para os carcinomas papilares invasivos pesquisados, 50% destes apresentaram metástase nodal e, em apenas 15% dos carcinomas tubulares, foram detectadas metástases nodais. Com relação à graduação histopatológica, a maioria dos animais com metástase nodal apresentou carcinomas de grau II (56%), sendo os de grau I e III representados por 22% cada.

Tabela 5 – Associação entre DVL (IT e PT) e as variáveis clínico-patológicas para as neoplasias mamárias do grupo mastectomia

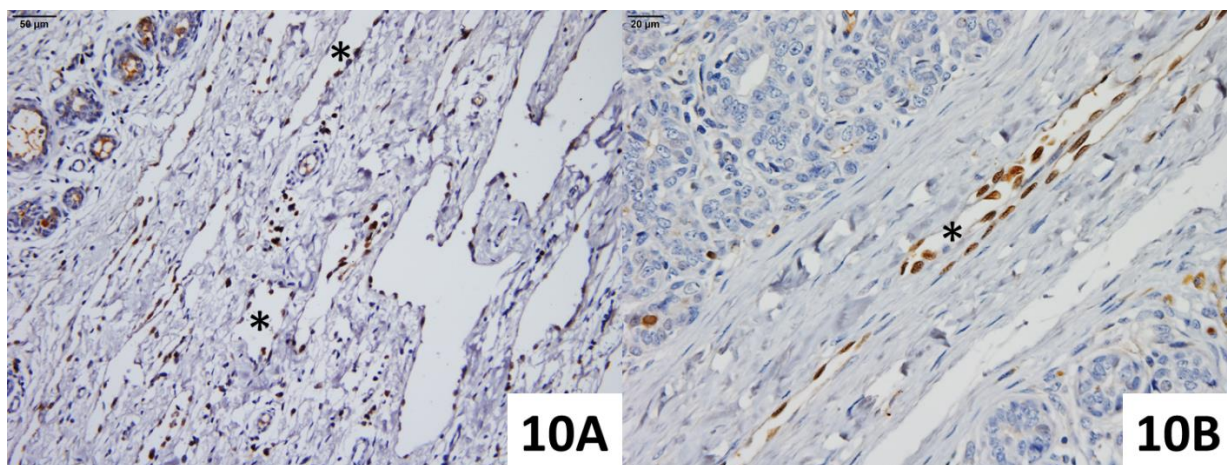
Característica	Número	DVL IT *	DVL PT *	Valor de p (IT)	Valor de p (PT)
Pseudociese					
Sim	10	1,75 (0-7,2)	3,7± 2,0	0,77	0,23
Não	10	1,8 (0-8,2)	4,7± 1,5		
Anticoncepcional					
Sim	7	1,4 (0-8,2)	4,1±2,7	0,63	0,86
Não	13	1,9 (0-7,2)	4,2±1,3		
Aderência					
Sim	4	1,5 (0-1,8)	3,5±2,0	0,26	0,46
Não	16	2,0 (0-8,2)	4,3±1,8		
Tamanho					
<3cm	12	2,0 (0-7,2)	4,34±1,9	0,73	0,75
≥3cm	8	1,8 (0-8,2)	4,05±1,8		
Grau histológico					
I	11	2,0 (0-8,2)	4,4±2,0	0,16	0,3
II	9	1,5 (0-3,8)	3,9±1,5		
Metástase linfonodo					
Sim	5	1,2 (0-1,8)	4,8±1,1	0,03	0,23
Não	15	2,1 (0-8,2)	4,0±2,0		
Escore de COX-2					
Baixo	7	1,8 (0-3,8)	3,6 (0-3,8)	0,98	0,53
Alto	13	1,8 (0-8,2)	4,3 (0-8,2)		
Grau de VEGF					
I e II	8	3,2±2,7	4,4±0,87	0,04	0,16
III	12	1,3±0,84	3,4±1,7		

* Mediana (min-máx) - Teste Mann-Whitney para variáveis não paramétricas (p<0,05).

Média ± desvio padrão - Teste-t para variáveis paramétricas (p<0,05).

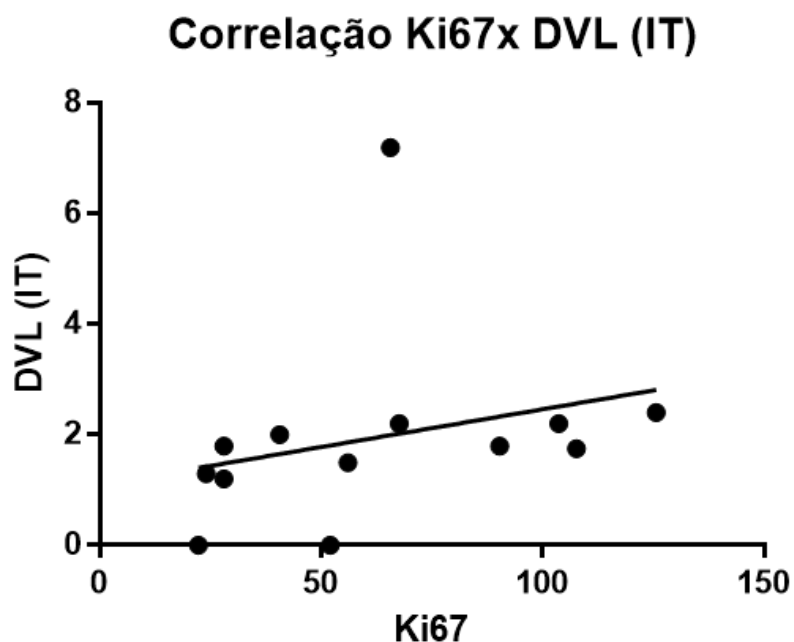
Fonte: elaborada pela Autora.

Figura 10 – Fotomicroscopia evidenciando endotélio de vasos linfáticos imunomarcados pelo anticorpo anti-Prox-1. (A) - Tecido mamário canino normal, com células endoteliais imunomarcadas (asteriscos), IHQ (20x, DAB/Hematoxilina). (B) - Carcinoma mamário canino, evidenciando vasos linfáticos intratumorais imunomarcados (asterisco), IHQ (40x, DAB/Hematoxilina).



Fonte: elaborada pela Autora.

Figura 11 – Correlação positiva ($p=0,01$) entre a Densidade de Vasos Linfáticos (DVL) intratumoral (IT) e o Índice de Proliferação (IP) detectado por imunomarcação com Ki67. Teste de correlação de Spearman ($p<0,05$).

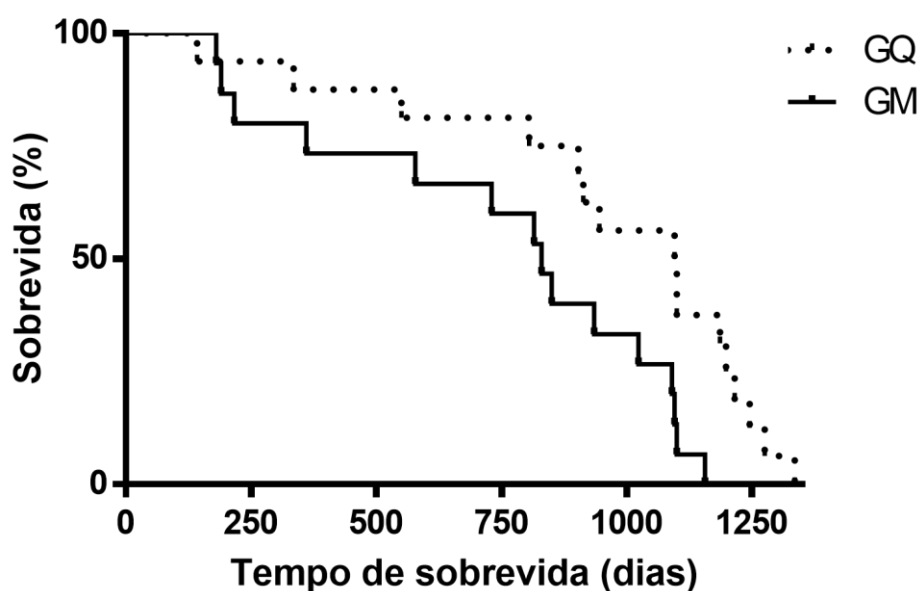


Fonte: elaborada pela Autora.

6.6 Sobrevida total

A sobrevida total do grupo previamente tratado com quimioterapia foi em média de 1098 dias, sendo esta significativamente maior quando comparada ao grupo tratado somente com mastectomia (830 dias) ($p=0,01$; Figura 12). Os óbitos foram relacionados às metástases pulmonares, hepáticas e ósseas.

Figura 12 – Curva de Kaplan-Meier da sobrevida total do grupo tratado com quimioterapia associada à mastectomia (GQ) versus grupo tratado somente com mastectomia (GM). O tempo médio de sobrevida do GQ foi significativamente maior quando comparado ao GM ($p=0,01$).



Fonte: elaborada pela Autora.

7 DISCUSSÃO

As neoplasias mamárias em cadelas possuem diferentes características no que se remete aos fatores predisponentes, assim como seu padrão de celularidade, microambiente, agressividade e prognóstico. Nos pacientes que compuseram esta pesquisa, os fatores de risco estudados corroboraram os da literatura, como a idade de acometimento mais frequente entre os 9 anos e o excesso de exposição hormonal nas cadelas não ovariectomizadas e que receberam anticoncepcionais (OLIVEIRA, 2003; SALVADOR, 2014). A idade é considerada um fator de risco no desenvolvimento de neoplasia mamária canina, somado à obesidade, raça, estimulação hormonal e dieta (SORENMO et al., 2011). De forma similar, os achados clínicos mais frequentes também condizem com a literatura, como a predominância de neoplasias múltiplas; maior acometimento das mamas abdominais caudais e inguinais; maioria não aderida e com diâmetro menor que 3cm (SORENMO et al., 2011; CASSALI et al., 2014).

A técnica de biópsia do linfonodo sentinela, descrita por Pinheiro et al. (2003), possui como principal vantagem a marcação e identificação da drenagem linfática tumoral. Nesta pesquisa, em nenhum caso houve efeitos colaterais ou reações alérgicas apresentadas pelos animais durante a aplicação do AP ou mesmo no pós-cirúrgico. Em mulheres, em 1 a 1,5% dos casos foi observado algum tipo de reação e, quando acometidas, responderam com excelentes resultados à corticoterapia (MARANHÃO et al., 2014; RODRIGUES, 2010; SHINZATO et al., 2006). A aplicação da técnica da BLS não foi eficaz em apenas um paciente, diagnosticado com carcinoma sólido. Neste, especificamente, não houve migração do corante pelos vasos linfáticos até atingir os linfonodos. Supõe-se que a não marcação é decorrente do tipo histológico da neoplasia, uma vez que a mesma apresenta comportamento biológico agressivo.

Notou-se que, apesar da escolha de um único nódulo para aplicação da técnica de marcação nodal, em sua maioria (77,7%), atingia os linfonodos bilaterais, independentemente do lado da cadeia mamária acometido pela neoplasia. Este achado ressalta a necessidade de se preconizar a mastectomia bilateral como terapêutica nos casos em que não haja prévia aplicação do corante, já que os linfonodos sentinelas podem estar posicionados tanto ipsilaterais quanto

contralaterais aos carcinomas mamários, corroborando a literatura consultada (MATOS et al., 2012; PATSIKAS et al., 2006; SUAMI et al., 2003). Chamou a atenção, nesta pesquisa, a marcação de linfonodos sentinelas que usualmente não são excisados na técnica de mastectomia bilateral preconizada por MacPhail (2014). Em um caso, houve marcação do linfonodo axilar ipsilateral e, em outro, a marcação do linfonodo poplíteo ipsilateral. Este fato destaca a importância da utilização da técnica de BLS em medicina veterinária, assim como já é usual em medicina humana, já que somente com essa abordagem é possível localizar, com precisão, o sítio dos linfonodos drenantes da neoplasia que devem ser excisados para o esvaziamento linfático correto durante a cirurgia oncológica. A metástase em linfonodo sentinela, segundo Sorenmo (2003), é um importante fator prognóstico para neoplasias mamárias, já que animais com esse padrão metastático apresentam menor sobrevida. Dada essa importância, ressalta-se a necessidade da precisão na localização do linfonodo sentinela.

A classificação histopatológica e a graduação da neoplasia, são fatores prognósticos importantes. Alguns tipos histológicos de neoplasias mamárias caninas requerem terapia adicional à excisão cirúrgica, como o carcinoma anaplásico, o carcinoma mamário de células escamosas, o carcinoma micropapilar e o carcinoma sólido, pois estes apresentam os piores prognósticos (MISDORP et al., 2002; CASSALI et al., 2014). Nos casos incluídos nesta pesquisa, foi observado que os carcinomas papilares, os carcinomas de células escamosas e o carcinoma sólido apresentavam metástase nodal com maior representatividade, o que corrobora a literatura no aspecto da individual agressividade pertinente aos tumores, conforme a classificação histopatológica (CASSALI et al., 2014). A maioria dos animais com metástase nodal apresentou carcinomas de graduação II (56%), o que não coincide com a literatura, que destaca os mais agressivos sendo os de grau III (CASSALI et al., 2014). Isso pode ser explicado pelo baixo número de carcinomas de grau III incluídos nesta pesquisa, assim como a menor prevalência dos carcinomas de grau III (SLEECKX et al., 2014b).

A quimioterapia metronômica é uma terapia amplamente utilizada em medicina e vem ganhando espaço em medicina veterinária para algumas neoplasias específicas. É uma terapia considerada segura e com poucos efeitos colaterais. Neste estudo não houveram efeitos adversos importantes durante a terapia, sendo que esta foi realizada por um curto período de tempo. Harper e Blackwood (2017) relataram,

como principal efeito adverso, decorrente do uso de ciclofosfamida, a cistite hemorrágica estéril (CHE), que se desenvolveu em 25% dos cães entre 7 a 686 dias (média de 110 dias) do início da terapia, considerada uma toxicidade maior do que a observada por outros autores (GAETA et al., 2014). Em outro estudo, 32% dos cães desenvolveram CHE após um tempo médio de tratamento com ciclofosfamida de 127.5 dias, porém a dose utilizada do medicamento foi de 25mg/m² em dias alternados, dose esta maior do que a preconizada pela maioria dos autores (MATSUYAMA; WOODS; MUTSAERS, 2017).

A QM possui um importante efeito antiangiogênico já estabelecido para diferentes neoplasias caninas, incluindo as do tecido mamário, o que foi novamente demonstrado neste estudo pela diferença da densidade microvascular entre os GM e GQ (ELMSLIE et al., 2008; BURTON et al., 2011; MENDES, 2014). Assim como observado neste estudo, outros pesquisadores também não observaram correlação entre DMV e VEGF, demonstrando que a expressão de fatores angiogênicos pela neoplasia, como o VEGF, variam amplamente, além dessa expressão poder ser alterada com a evolução tumoral (HLATKY; HAHNFELDT; FOLKMAN, 2002).

De forma similar a associação da DMV com a COX-2 foi observada somente no grupo tratado com quimioterapia, em que altos escores de COX-2 foram associados com altas DMV, o que sugere um papel da COX-2 na angiogênese tumoral assim como resultados obtidos por Queiroga et al. (2011). O mesmo não foi observado no GM no qual, altas DMVs foram observadas nas neoplasias com baixo escore de COX-2. Esta ausência de correlação pode ser explicada pela diferença na expressão de COX-2 nos diferentes tipos histológicos e celulares das neoplasias, sendo que células de origem mesenquimal demonstraram fraca ou ausência de expressão de COX-2, diferentemente das células epiteliais, corroborando com Queiroga et al. (2011). Ainda nesta pesquisa, não foi observada correlação da COX-2 com graduação histológica, VEGF e DVL. Queiroga et al. (2011) detectaram correlação da COX-2 com VEGF, reforçando seu papel na angiogênese tumoral, além de demonstrar correlação da COX-2 com alto índice mitótico. No câncer de mama na mulher, foi observada correlação significativa entre linfangiogênese e a expressão de COX-2 e VEGF, sendo que o mesmo não foi observado no presente estudo (ZHANG et al., 2008).

Este foi o primeiro trabalho a avaliar os efeitos da quimioterapia metronômica em vasos linfáticos de neoplasias mamárias caninas, não sendo observados efeitos significativos. Apesar de a literatura acreditar em possíveis efeitos antilinfangiogênicos

de terapias, ainda não existem fármacos aprovados para estudos pré-clínicos em humanos para avaliar tal eficácia (HU; LUO, 2018). Mais pesquisas devem ser realizadas visando avaliar os efeitos da QM em células endoteliais linfáticas em proliferação nos casos de neoplasias.

Como efeito benéfico da QM foi observado que no GQ houve aumento no índice apoptótico (IA) das células neoplásicas quando comparado ao GM, demonstrando aumento da morte celular destas células quando empregada a terapia antiangiogênica. A literatura descreve que a combinação nos índices de proliferação celular e apoptose pode proporcionar perspectiva mais realista do comportamento da neoplasia, sendo o IA um provável fator prognóstico (OESTERREICH et al., 2003). Lipponem (1999) correlacionou, no câncer de mama na mulher, o IA com o diâmetro da neoplasia, grau histológico e índice de proliferação celular. Neste estudo, o IA não se correlacionou com DMV e nem com DVL, demonstrando que este índice não está associado com angiogênese ou linfangiogênese, mas pode ser empregado como fator prognóstico assim como para avaliação da eficácia de terapias.

Embora não se tenha observado efeito na redução na DVL nas neoplasias tratadas, a QM foi utilizada com sucesso e com baixa incidência de efeitos colaterais, demonstrando ser uma ferramenta terapêutica importante e segura em oncologia veterinária. Destaca-se, neste estudo, um importante efeito da quimioterapia metronômica no aumento da sobrevida dos animais do GQ que apresentou uma sobrevida média de 1098 dias, quando comparado ao grupo tratado somente com mastectomia com sobrevida média de 830 dias. Resultados similares também foram obtidos por Campos et al. (2018) quando houve associação da QM com mastectomia.

No presente estudo, as DVL IT e PT, não mostrou associação com pseudociese, uso de anticoncepcional, aderência da neoplasia, tamanho do tumor e grau histológico, havendo, apenas, associação da DVL IT com metástase nodal, grau de VEGF e IP (Ki67). Diferente de Abe et al. (2016), que estudaram o significado da DVL em tumores de mama na mulher, a DVL tanto IT quanto PT não mostraram relação com as observações clínico-patológicas nas neoplasias mamárias caninas. Segundo Abe et al. (2016), que avaliaram o total da DVL, não discriminando a DVL IT e PT, houve relação da DVL com o “status” de menopausa, o tamanho do tumor, metástase nodal, “status” para o receptor de estrógeno e com a invasão de células tumorais em vasos linfáticos e sanguíneos. No mesmo estudo, não houve relação entre a DVL com o grau histológico, com o “status” para o receptor de progesterona e

com HER-2 (receptor do fator de crescimento epidermal humano do tipo 2) (ABE et al., 2016). Neste trabalho, não foi realizada a correlação entre a DVL e a invasão de vasos linfáticos e sanguíneos por células tumorais, devido ao baixo número encontrado destas variáveis.

A DVL pode ser extremamente diferente no ambiente intratumoral e peritumoral devido à intensa heterogeneidade da linfangiogênese. Assim, a localização dos vasos linfáticos na neoplasia pode determinar sua função no microambiente tumoral. Foi demonstrado que alta DVL e invasão tumoral linfática podem ser indicadores prognósticos negativos em tumores de mama na mulher, mas sem distinção da localização dos vasos linfáticos (ZHANG et al., 2017). As células tumorais tendem a preferir os vasos linfáticos peritumorais, do que os intratumorais, como rota de metástase, o que pode estar relacionado às características histológicas destes vasos (HU; LUO, 2018). Com o mesmo princípio, a inibição dos vasos linfáticos peritumorais é mais eficaz na inibição da progressão da doença do que a inibição dos vasos linfáticos intratumorais (HU; LUO, 2018).

Em relação à distribuição da DVL neste estudo, foi observado que em 100% dos casos foram detectados vasos linfáticos peritumorais e que em 89,6% dos casos foram detectados vasos linfáticos intratumorais demonstrando uma melhor marcação imuno-histoquímica observada por Sleenckx et al. (2014b) que utilizaram o mesmo anticorpo Prox-1. A maioria dos estudos que falharam na detecção da DVL IT utilizou outros anticorpos como o LYVE-1 ou D2-40, sendo que este último não demonstrou imunorreatividade com tecidos mamários caninos (VAN DER AUWERA et al., 2005; SLEECKX et al., 2013). As diferenças na detecção de DVL podem ser explicadas, ainda, pela heterogeneidade na natureza dos tumores estudados. De uma forma geral, neste estudo, corroborando os relatos de Sleenckx et al. (2014b), a DVL foi superior na periferia do tumor do que intratumoral, o que requer atenção dos pesquisadores no emprego de fármacos que possam provocar esta inibição, já que essa parece ser a via preferencial de metástase das neoplasias. Ainda similar aos achados de Sleenckx et al. (2014b), a DVL foi significativamente maior nos tecidos mamários normais do que nos tecidos neoplásicos. Essa diferença pode demonstrar que a DVL isolada não necessariamente implica em linfangiogênese ativa e que a associação da DVL com índice de proliferação das células endoteliais pode ser mais significativa na determinação da linfangiogênese ativa (VAN DER AUWERA et al., 2005; SLEECKX et al., 2014b).

A metástase nodal se correlacionou com a DVL IT de forma oposta ao esperado, sendo que, quanto menor a DVL IT, maior a frequência de metástase nodal e vice-versa oposto ao encontrado por Abe et al. (2016). Quando a associação é feita com a DVL PT ou DVL total, não há relação com metástase nodal. Este achado pode estar relacionado ao baixo número de animais com metástase nodal nesta pesquisa ou, mesmo pode indicar uma possível rota de metástase não linfática nas neoplasias estudadas. Em 2018, Hu e Luo descrevem que a linfangiogênese tumoral, apesar de ser um importante fator prognóstico para pacientes com carcinomas, nem sempre possui relação com metástase nodal. Isso pode ser devido aos vasos linfáticos colapsarem e se tornarem afuncionais durante a progressão tumoral, além do maior papel dos vasos linfáticos peritumorais nas rotas de metástase (HU; LUO, 2018).

A família dos marcadores moleculares VEGF apresenta um papel importante na angiogênese e linfangiogênese tumoral, sendo que o VEGF-A e o VEGF-C são amplamente encontrados nos tecidos tumorais e, usualmente, se correlacionam com metástase tumoral (NICOSIA, 1998; KARKKAINEN; PETROVA, 2000). Foi demonstrado também que a subfamília VEGF-A é um fator mais específico para angiogênese tumoral, enquanto o VEGF-C é mais específico para linfangiogênese (DVORAK et al., 1995; JELTSCH et al., 1997). Outros estudos demonstraram que ambos VEGF-A e VEGF-C atuam tanto na angiogênese como na linfangiogênese tumoral (RAHMAN; MOHAMMED, 2015).

No presente estudo, foi demonstrado que o VEGF-A possui relação com DVL intratumoral e total, pois em tumores com VEGF que apresentaram alta intensidade de marcação (grau III) foi encontrada menor DVL quando comparado aos tumores com VEGF de intensidade de marcação graus I e II. Isso pode ser explicado pela maior afinidade desta subfamília com a indução de angiogênese tumoral e pelo reduzido número de tumores com graduação I e II de VEGF na presente pesquisa. Alguns autores indicam que certos tumores podem ser desprovidos de sistema linfático, assim como podem destruir linfáticos com seu crescimento, o que poderia justificar a menor DVL em tumores com VEGF grau III, ou seja, considerados mais agressivos (RAHMAN; MOHAMMED, 2015). Outros estudos em tumores de mama na mulher demonstraram resultados contraditórios em relação à expressão de VEGF e os principais aspectos de linfangiogênese (CURRIE et al., 2004; WATANABE et al., 2005). De qualquer maneira, as correlações com VEGF podem sofrer influências da

agressividade da neoplasia, tamanho na neoplasia, microambiente e influência de outros fatores linfangiogênicos.

Neta pesquisa, houve forte correlação entre índice de proliferação celular e a DVL IT, demonstrando que esta última pode ter maior significado prognóstico quando comparada à DVL peritumoral ou total, como também se correlacionar com maior proliferação celular. O Ki67 é um marcador molecular de índice de proliferação celular mais específico do que o índice mitótico para as neoplasias, sendo um marcador amplamente utilizado como fator prognóstico (PENA et al., 1998; ZUCCARI et al., 2008). Quanto maior o IP, pior o prognóstico, maior risco de metástase e menor sobrevida total em cadelas (PENA et al., 1998; ZUCCARI et al., 2008).

8 CONCLUSÕES

A quimioterapia metronômica preconizada neste estudo reduziu a densidade microvascular e aumentou o índice apoptótico das células tumorais, porém não interferiu na densidade de vasos linfáticos, mas pode ter influência nas células endoteliais linfáticas em proliferação nas neoplasias mamárias. Foi demonstrado, no presente estudo, que a densidade de vasos linfáticos intratumoral pode ser um potencial fator prognóstico para as neoplasias mamárias caninas assim como alvo de terapias. A forte correlação da DVL intratumoral com proliferação celular sugere importante papel na progressão tumoral por aumentar a linfangiogênese. Dessa forma, presume-se que a quimioterapia metronômica possui importante efeito antiangiogênico, além de aumentar a sobrevida dos animais tratados, sendo uma ferramenta na terapêutica oncológica.

REFERÊNCIAS

ABE, N. et al. Clinicopathological significance of lymphangiogenesis detected by immunohistochemistry using D2-40 monoclonal antibody in breast cancer. **Fukushima J Med Sci.**, v.62, n.1, p.57-63, jun. 2016.

ARAÚJO, M.R. et al. HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival. **Res Vet Sci.**, v.106, p. 121-130, jun. 2016.

ARNES, J.B. et al. Vascular proliferation is a prognostic factor in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.**, v.133, p.501–510, jun. 2012.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nat Rev Cancer**, v.3, p.401-10, jun. 2003.

BERTOLINI, F.; PAUL, S.; MANCUSO, P. Maximum tolerable dose and low- dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells. **Cancer Res.**, v. 63, p. 4342-4346, aug. 2003.

BESERRA, H.E.O. **Metástases de carcinoma de mama em cadelas: avaliação da técnica de linfonodo sentinela.** 2014. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu. 2014.

BIESAGA, B.; NIEMIEC, J.; ZIOBRO, M. Microvessel density and status of p53 protein as potencial prognostic factors for adjuvant anthracycline chemotherapy in retrospective analysis of early breast cancer patients group. **Pathol Oncol Res.**, v.18, n.4, p.949-960, oct. 2012.

BILLER, B. Metronomic chemotherapy in veterinary patients with cancer: rethinking the targets and strategies of chemotherapy. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v.44, n.5, p.817-29, sep. 2014.

BRODEY, R.S.; GOLDSCHMIDT, M.A.; ROSZEL, J.R. Canine mammary gland neoplasms. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.19, p.61-90, 1983.

BROWDER, T. et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. **Cancer Res.**, v. 60, n.7, p.1878–1886, apr. 2000.

BURTON, J.H. et al. Low-dose cyclophosphamide selectively decreases regulatory T Cells and inhibits angiogenesis in dogs with soft tissue sarcoma. **J Vet Intern Med.**, v.25, n.4, p. 920-926, jul-aug. 2011.

CAMPOS, C.B. et al. Adjuvant thalidomide and metronomic chemotherapy for the treatment of canine malignant mammary gland neoplasms. **In Vivo**, v.32, n.6, p.1659-1666, nov-dec. 2018.

CANCEDDA, S. et al. Hypofractionated radiotherapy for macroscopic canine soft tissue sarcoma: a retrospective study of 50 cases treated with a 5 x 6 gy protocol with or without metronomic chemotherapy. **Vet Radiol Ultrasound.**, v.57, n.1, p.75-83, jan. 2016.

CARMELIET, P; JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v.407, n.6801, p.249-57, sep. 2000.

CASSALI, G.D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors - 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.7, n.2, p.38-69, 2014.

CHAN, C.M. et al. Incidence of sterile hemorrhagic cystitis in tumor-bearing dogs concurrently treated with oral metronomic cyclophosphamide chemotherapy and furosemide: 55 cases (2009-2015). **J Am Vet Med Assoc.**, v.249, n.12, p. 1408-1414, dec. 2016.

CHANG, S. et al. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 Cases. **J Am Vet Med Assoc.**, v. 227, n. 10, 2005.

COLLEONI, M. et al. Low-dose oral methotrexate and cyclophosphamide in metastatic breast cancer: antitumor activity and correlation with vascular endothelial growth factor levels. **Ann Oncol.**, v.13, n.1, p.73-80, jan. 2002.

CUNNICK, G. H. et al. Lymphangiogenesis and breast cancer metastasis. **Histol Histopathol.**, v.17, n.3, p.863-870, 2002.

CURRIE, M.J., et al. Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with hypoxia inducible factor (HIF-1alpha) and the HIF-1alpha target gene DEC1, but not lymph node metastasis in primary human breast carcinomas. **J Clin Pathol.**, v.57, n.8, p.829-834, aug. 2004.

DE NARDI, A. B. et al. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Arch. Vet. Sci.**, v.7, n.2, p.15-26, 2002.

DOWSETT, M. et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. **J Natl Cancer Inst.**, v.103, n.22, p.1656-1664, nov. 2011.

DUBOIS, R.N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease **FASEB J.**, v.12, n.12, p.1063–1073, sep. 1998.

DVORAK, H.F et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **Am J Pathol.**, v.146, n.5, p.1029–39, may 1995.

ELMSLIE, R.E.; GLAWE, P.; DOW, S.W. Metronomic Therapy with Cyclophosphamide and Piroxicam effectively delays tumor recurrence in dogs with incompletely resected soft tissue sarcomas. **J Vet Intern Med.**, v.22, n.6, p.1373-1379, nov-dec. 2008.

GAETA, R. et al. Risk factors for development of sterile haemorrhagic cystitis in canine lymphoma patients receiving oral cyclophosphamide: a case-control study. **Vet Comp Oncol.**, v.12, n.4, p.277-86, dec. 2014.

GASPARINI, G.; BIGANZOLI, E.; BONOLDI, E. Angiogenesis sustains tumor dormancy in patients with breast cancer treated with adjuvant chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat.**, v.65, n.1, p.71-75, jan. 2001.

GIOVANNINI, M. et al. Antiangiogenic strategies in breast cancer management. **Crit Rev Oncol Hematol.**, v.76, n.1, p.13-35, oct. 2010.

GIULIANO, A.E. et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: A randomized clinical trial. **JAMA**, v. 305, n.6, p.659-75, feb. 2011.

GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Vet Pathol.**, v.48, n.1, p.117-131, jan. 2011.

GOTTWALD, D.; ZUR, E.; HUND, H.V.M.B. **Statistical analysis of observations of the practice of veterinary pathology 1990-1995**. 1998. Dissertation (Doctoral) - University of München, Munich, 1998.

HLATKY, L.; HAHNFELDT, P.; FOLKMAN, J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. **J Natl Cancer Inst.**, v.94, n.12, p.883-893, 2002.

HU, X.; LUO, J. Heterogeneity of tumor lymphangiogenesis: Progress and prospects. **Cancer Sci.**, v.109, n.10, p.3005-3012, oct. 2018.

JELTSCH, M. et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. **Science**, v.276, n.5317, p.1423-5, may 1997.

KARKKAINEN, M.J.; PETROVA, T.V. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Oncogene**, v.19, n.49, p.5598–605, nov. 2000.

KELLEY M.C., HANSEN N.; MCMASTERS K.M. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. **Am J Surg.**, v. 188, n.1, p. 49–61, jul. 2004.

KLEMENT, G. et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. **J Clin Invest.**, v.105, n.8, p.15-24, apr. 2000.

LANA, S.E. et al. **Small Animal Oncology**. Saunders Company, Philadelphia, 2007, p.619-636.

LAVALLE, G.E et al. COX-2 expression in canine mammary carcinomas correlation with angiogenesis and overall survival. **Vet Pathol.**, v.46, n.6, p.1275–1280, nov. 2009.

LIPPONEN, P. Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. **Endocr Relat Cancer.**, v.6, n.1, p.13-16, mar. 1999.

LUNA, L. G. Rotine Staining Procedures. In: LUNA, L. G. (eds). **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. New York: McGrae-Hill Book Co, 1968, Cap. 4 p.32-46.

MAAE, E. et al. Estimation of Immunohistochemical Expression of VEGF in Ductal Carcinomas of the Breast. **J Histochem Cytochem.**, v.59, n.8, p.750-760, aug. 2011.

MACKEY, J.R. et al. Controlling angiogenesis in breast cancer: A systematic review of anti-angiogenic trials. **Cancer Treat Rev.**, v.38, n.6, p.673-688, oct. 2012.

MacPHAIL, C.M. Cirurgia dos Sistemas Reprodutivo e Genital. In: FOSSUM, T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 4ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014, p.809-814.

MARANHÃO, M.V.M. Reação alérgica ao corante azul patente em cirurgia de mama – relato de caso. **Rev. Bras. Anest.**, v. 66, p. 433-436, 2014.

MARSON, L.P. et al. The effect of tamoxifen on breast tumour vascularity. **Breast Cancer Res Treat.**, v.66, n.1, p.9–15, mar. 2001.

MARTIN, L. et al. Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. **Br J Cancer.**, v.76, n.8, p.1046-1054, 1997.

MATOS, A.J.F. et al. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures. **Vet. J.**, v.193, n.1, p.24-31, jul. 2012.

MATSUYAMA, A.; WOODS, J.P.; MUTSAERS, A.J. Evaluation of toxicity of a chronic alternate day metronomic cyclophosphamide chemotherapy protocol in dogs with naturally occurring cancer. **Can Vet J.**, v.58, n.1, p.51-55, jan. 2017.

MENDES, A.R. **Avaliação da quimioterapia metronômica em carcinomas mamários de cadelas por imunomarcações.** 2014. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araçatuba. 2014.

MENDES, A.R. et al. Proapoptotic effects of metronomic chemotherapy in canine mammary carcinomas. In: 3rd WORLD VETERINARY CANCER CONGRESS, May. 25-29, 2016, Foz do Iguaçu, Brazil. **Proceedings of the Veterinary Cancer Society.** Foz do Iguassu: WVCC, 2016, p. 132.

MISDORP, W. Canine mammary tumours: Protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. **Vet Q.**, v.10, n.1, p.26-33, jan. 1998.

MISDORP, W. Tumors of the Mammary Gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals.** 4ed., Iowa State Press, 2002, p.575-606.

MUTSAERS, A.J. Metronomic Chemotherapy. **Top Companion Anim Med.**, v.24, n.3, p.137-143, aug. 2009.

NICOSIA, R.F. What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? **Am J Pathol.**, v.153, p.11–6, 1998.

NIEMIEC, J.A. et al. Prognostic role of lymphatic vessel density and lymphovascular invasion in chemotherapy-naive and chemotherapy-treated patients with invasive breast cancer. **Am J Transl Res.**, v.9, n.3, p.1435-1447, mar. 2017.

OLIVEIRA, L. O. et al. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scient. Vet.**, v.31, n.2, p.105-110, 2003.

OWEN, L.N. **Classification of tumors in domestic animals.** World Health Organization. Geneva, 1980.

PATSIKAS, M.N. et al. The Lymph Drainage of the Neoplastic Mammary Glands in the Bitch: A Lymphographic Study. **Anat Histol Embryol.**, v.35, n.4, p. 228–234, aug. 2006.

PENA, L.L. et al. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. **J Vet Diagn Invest.**, v.10, n.3, p.237-246, jul. 1998.

PENA, L. et al. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. **Vet. Pathol.**, v.51, n.1, p.127-45, jan. 2014.

PINHEIRO, L.G.P. et al. Estudo experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e Tecnécio Tc99m. **Acta Cirur Bras.**, v.18, n. 6, 2003.

PINTO, R.M.M.O. **Neoplasias Mamárias em Cadelas e Gatas.** 2009. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

QUEIROGA, F.L. et al. COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. **Vet J.**, v.189, n.1, p.77–82, jul. 2011.

RAHMAN, M; MOHAMMED, S. Breast cancer metastasis and the lymphatic system (Review). **Oncol Lett.**, v.10, n.3, p.1233-1239, sep. 2015.

REESE, S. et al. Tegumento Comum (*Integumentum commune*). In: KÖNIG, H.E.; LEIBICH, H. **Anatomia dos animais domésticos**. 4ªed. Porto Alegre: Artmed, 2011. p.629 – 680.

RIVERA, P.; EULER H. V. Molecular Biological Aspects on Canine and Human Mammary Tumors. **Vet Pathol.**, v.48, n.1, p.132-146, jan. 2011.

RODRIGUES, M.A.P.A.; Efeito adverso do corante azul patente em pacientes com câncer de mama, submetida à segmentectomia e biópsia de linfonodo sentinela (LS): relato de caso. **Rev Ass Med Flum.**, v.43, p.18-19, 2010.

RODRIGUES, P. et al. The single-nucleotide polymorphisms +936 C/T VEGF and 2710 C/T VEGFR1 are associated with breast cancer protection in a Spanish population. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.133, n.2, p.769-778, 2012.

SALVADOR, R.C.L. **Expressão gênica e proteica da COX-2 e c-KIT em neoplasias mamárias de cadelas**. 2014. 88f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal. 2014.

SAKORAFAS, G.H.; PEROS, G. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: what a physician should know, a decade after its introduction in clinical. **Eur J Cancer Care (Engl.)**, v. 16, n.4, p. 318-321, jul. 2007.

SHINZATO, J.Y. et al. Reação anafilática ao corante azul patente durante a biópsia do linfonodo sentinela em câncer de mama inicial: relato de caso. **Rev Bras Ginecol Obst.**, v.28, n.12, p.728-732, 2006.

SLEECKX, N. et al. Canine Mammary Tumors, an Overview. **Reprod Domest Anim.**, v.46, n.6, p.1112-31, dec. 2011.

SLEECKX, N. et al. Evaluation of immunohistochemical markers of lymphatic and blood vessels in canine mammary tumours. **J Comp Pathol.**, v.148, n.4, p.307-317, may 2013.

SLEECKX, N. et al. Angiogenesis in canine mammary tumours: a morphometric and prognostic Study. **J Comp Pathol.**, v.150, n.2-3, p.175-183, feb-apr. 2014a.

SLEECKX, N. et al. Lymphangiogenesis in canine mammary tumours: a morphometric and prognostic study. **J Comp Pathol.**, v.150, n.2-3, p.184-193, feb-apr. 2014b.

SOLANO-GALLEGO, L.; MASSERDOTTI, C. Reproductive System. In: RASKIN, R.E.; MEYER, D. **Canine and Feline Cytology**. 3ed. St. Louis: Elsevier, 2016, p. 313-52.

SORENMO, K.U; SHOFER, F.S.; GOLDSCHMIDT, M.H. Effect of Spaying and Timing of Spaying on Survival of Dogs with Mammary Carcinoma. **J Vet Intern Med.**, v.14, n.3, p.266-270, may-jun. 2000.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v.33, p.573–596, 2003.

SORENMO, K.U. et al. Canine mammary gland tumors; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Vet Comp Oncol.**, v.7, n.3, p.162–172, sep. 2009.

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

STACKER, S.A.; ACHEN, M.G. From anti-angiogenesis to anti-lymphangiogenesis: emerging trends in cancer therapy. **Lymphat Res Biol.**, v.6, n.3-4, p.165-72, 2008.

STRAW, R.C. Treatment of mammary gland tumors and perianal neoplasia. In: THE NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE, Jan. 8-12, 2005, Orlando, Florida. **Proceedings...** Orlando: NAVC, 2005, p. 672-675.

SUAMI, H. et al. Lymphatic territories (lymphosomes) in a canine: an animal model for investigation of postoperative lymphatic alterations. **Plos One**, v.8, n.7, jul. 2013.

VANDER AUWERA, I. et al. Tumor lymphangiogenesis in inflammatory breast carcinoma: a histomorphometric study. **Clin Cancer Res.**, v.11, n.21, p.7637-42, nov. 2005.

VCOG. Veterinary cooperative oncology group - common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1. **Vet Comp Oncol.**, v.14, n.4, p.417-446, dec. 2016.

WANG, Y. et al. Involvement of breast cancer stem cells in tumor angiogenesis. **Oncol Lett.**, v.14, n.6, p.8150-8155, dec. 2017.

WATANABE, O. et al. Expression of a CD44 variant and VEGF-C and the implications for lymphatic metastasis and long-term prognosis of human breast cancer. **J Exp Clin Cancer Res.**, v.24, n.1, p.75-82, mar. 2005.

WEAVER, D.L. Pathology evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: protocol recommendations and rationale. **Mod Pathol.**, v.23, n.2, p.26–32, may 2010.

YAMASHITA-KASHIMA, Y. et al. Biomarkers for antitumor activity of bevacizumab in gastric cancer models. **BMC Cancer**, v.12, n.37, p.1-12, jan. 2012.

ZHANG, X.H. et al. Coexpression of VEGF-C and COX-2 and its association with lymphangiogenesis in human breast cancer. **BMC Cancer**, v.8, n.4, jan 2008.

ZHANG, S. et al. High lymphatic vessel density and presence of lymphovascular invasion both predict poor prognosis in breast cancer. **BMC Cancer**, v.17, n.1, p.335, may 2017.

ZUCCARI, D.A.P.C. et al. Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: Correlation of prognostic factors and clinical outcome. **Pesq Vet Bras.**, v.28, n.4, p. 207-215, 2008.

APÊNDICE A - FICHA DE TUMORES DE MAMA EM CADELAS

Nome:	Data:
Raça:	Sexo:
Peso:	Idade:
Proprietário:	
Endereço:	
Telefone/e-mail:	

I) FORMULÁRIO GERAL DE AVALIAÇÃO

1. Ciclo Estral: ()Regular ()Irregular ()Não apresenta ()NSI
2. N° de Gestações: ()Ausente ()Uma ()Outros valores:_____ ()NSI
3. Pseudogestação: ()Sim (Frequência:_____) () Não
4. Abortos: ()Sim ()Não
5. Castração: ()Sim (Data:) ()Não
()Eletiva ()Pseudociese ()Tumor de mama ()Cesariana ()Piometra ()NSI
6. Alterações Uterinas (secreção)/Quando?: ()Sim_____ ()Não
7. Cruzamentos sem prenhez: ()Sim ()Não
8. Uso de hormônios: ()Anticoncepcionais ()Abortivos ()Não
(Tipo:_____) (Frequência:_____)
9. Efeitos colaterais (pós-hormônio): ()Sim ()Não
10. Tumores prévios: ()Sim ()Mama ()Outros
(Localização:_____) (Evolução:_____)
(Cirurgia:_____) (Recidivas:_____)
11. Tipo de Dieta: ()Caseira ()Ração ()Outros_____
12. Tipo de Água: ()Mineral ()Torneira ()Poço Artesiano
13. Outras Observações:

*NSI: não sabe informar

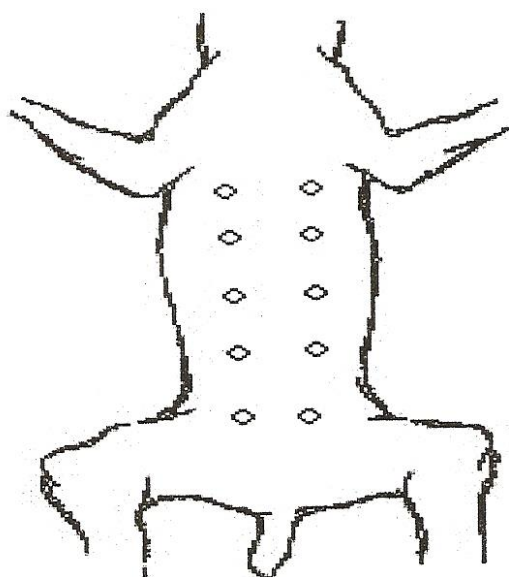
II) FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

1. Histórico do animal/Evolução:

2. Diâmetro Máximo do(s) Tumor(es):

 Menor que 3cm 3-5cm Maior que 5cm Outros:

 Descrição/Localização: _____



3. Invasão de gânglios linfáticos à palpação:

 Não evidente Evidente. Onde? _____

 Confirmada com resultado histo ou citopatológico: Sim Não

4. Metástases à Distância:

 Ausente Presente. Onde? _____

5. Crescimento Tumoral:

 Lento – Tempo aproximado: _____ Rápido – Tempo aproximado: _____

6. Ulceração:

 Ausente Presente. Onde? _____ Tempo aproximado: _____
7. Presente de contaminação: Sim Não8. Quanto à infiltração de nódulo (s): Pedunculado Aderido

Onde: _____

III) SISTEMA TNM (TUMOR/NÓDULO/METÁSTASE)

T: diâmetro máximo do tumor

T₁: < 3cm de diâmetro

T₂: 3-5cm de diâmetro

T₃: > 5cm de diâmetro

N: envolvimento de linfonodos regionais

N₀: ausência de metástases (cito ou histopatológico)

N₁: presença de metástases (cito ou histopatológico)

M: presença de metástases à distância

M₀: ausência de metástases

M₁: presença de metástases à distância

<i>ESTÁDIO</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>
I	T ₁	N ₀	M ₀
II	T ₂	N ₀	M ₀
III	T ₃	N ₀	M ₀
IV	Qualquer	N ₁	M ₀
V	Qualquer	Qualquer	M ₁

ESTADIO: _____

ANEXO 1 – COMITÊ DE ÉTICA



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**



**CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals**

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Efeitos da quimioterapia metronômica sobre angiogênese e linfangiogênese tumoral de carcinomas mamários de cadelas**", Processo FOA nº 00722-2016, sob responsabilidade de Maria Cecília Rui Luvizotto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 14 de Dezembro de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 25 de Novembro de 2019.


DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 25 de Dezembro de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Effects of metronomic chemotherapy on angiogenesis and tumoral lymphangiogenesis in canine mammary carcinomas**", Protocol FOA nº 00722-2016, under the supervision of Maria Cecília Rui Luvizotto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 14, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: November 25, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: December 25, 2019.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br