

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DO MARCADOR TUMORAL**  
**CA 15.3 EM CADELAS HÍGIDAS POR**  
**QUIMIOLUMINESCÊNCIA**

**Silvana Ricardi Bicalho**

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DO MARCADOR TUMORAL  
CA 15.3 EM CADELAS HÍGIDAS POR  
QUIMIOLUMINESCÊNCIA**

**Silvana Ricardi Bicalho**

**Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (área de concentração em Clínica Médica Veterinária).

JABOTICABAL – SP

2012

B583q Bicalho, Silvana Ricardi  
Quantificação sérica do marcador tumoral CA 15.3 em cadelas  
hígidas por quimioluminescência / Silvana Ricardi Bicalho. --  
Jaboticabal, 2012  
x, 28 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012  
Orientador: Aureo Evangelista Santana  
Banca examinadora: Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, Maria  
Angélica Dias  
Bibliografia

1. Antígenos tumorais. 2. MUC1. 3. Neoplasia mamária. 4.  
Quimioluminescência. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**SILVANA RICARDI BICALHO** – nascida em 14 de fevereiro de 1964, na cidade de Botucatu-SP, filha de Olímpio Areias Bicalho e Neyde Ricardi Bicalho. Graduiu-se Médica Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) em 1989. Atuou na área de clínica e cirurgia de pequenos animais entre 1990 e 2008. Ingressou no curso de mestrado na área de Clínica Médica do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal-SP, em março de 2010, sob orientação do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana.

Viver é acalantar sonhos e esperanças,  
fazendo da fé a nossa inspiração maior.  
É buscar nas pequenas coisas,  
um grande motivo para ser feliz!

*Mário Quintana*

Dedico

Aos meus pais,  
pelo amor, confiança, apoio incondicional  
e por todo o investimento em minha formação intelectual.

Ao Celso,  
meu anjo protetor e amigo,  
pelo incentivo, dedicação, companheirismo e paciência.

Aos meus irmãos e sobrinhos,  
que de muitas formas contribuíram para a realização deste sonho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde e coragem para enfrentar os desafios e seguir em frente;

Ao meu orientador, Professor Dr. Aureo Evangelista Santana, pela oportunidade oferecida, pela amizade e disponibilidade constantes e por todo o aprendizado proporcionado;

À Professora Dr<sup>a</sup>. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, pela amizade, carinho e auxílio incansável;

À Professora Dr<sup>a</sup>. Mirela Tinucci Costa, pela contribuição, amizade e carinho;

Ao Professor Dr. Aparecido Antonio Camacho, pela composição da banca de qualificação e por suas valiosas considerações;

À professora Dr<sup>a</sup> Maria Angélica Dias, pelo carinho, dedicação e objetividade na composição da banca de defesa.

Aos amigos Aline, Ana Livia, Andressa, Cesaltina, Leandro, Letícia, Mariana, Mateus, Mônica, Natália, Natan, Sofia, por toda ajuda e por me receberem de maneira acolhedora;

Ao Eugênio, pela colaboração e amizade;

À Shizuko, pela atenção, disponibilidade e paciência;

Às funcionárias da Biblioteca da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal-SP, por serem tão atenciosas e solícitas;

A CAPES, pelo apoio financeiro;

À Darlene, amiga de longa data, por abrir as portas de sua clínica e me auxiliar de forma tão gentil e generosa;

À D. Marlene, minha segunda mãe, por me receber carinhosamente em sua casa e em seu coração.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
SUMMARY .....	x
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
Marcadores tumorais .....	5
CA 15.3.....	6
Ensaio Imunoluminométrico.....	8
III. OBJETIVOS.....	9
Geral .....	9
Específicos.....	9
IV. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
Aspectos éticos.....	10
Primeira etapa.....	10
Grupos experimentais .....	10
Avaliação clínica.....	10
Obtenção das amostras de sangue.....	10
Processamento das amostras .....	11
Análises Laboratoriais para seleção das parcelas experimentais .....	11
Hemograma .....	11
Bioquímica Sérica .....	12
Avaliação quantitativa do CA 15.3.....	12
Princípios do teste (técnica de sandwich) .....	12
Segunda etapa.....	13
Grupos experimentais .....	13



Obtenção das amostras .....	13
Processamento das amostras .....	13
Análise Estatística .....	14
V. RESULTADOS.....	15
VI. DISCUSSÃO.....	17
VII. CONCLUSÕES.....	19
VIII. REFERÊNCIAS .....	20

## QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DO MARCADOR TUMORAL CA 15.3 EM CADELAS HÍGIDAS POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA

**RESUMO** – Tendo em vista a alta incidência das neoplasias mamárias e metástases em cadelas e objetivando contribuir com a oncologia veterinária na padronização de um teste simples, eficaz e acessível no diagnóstico precoce destas metástases, esse estudo teve como meta avaliar o marcador tumoral CA 15.3 no soro de cadelas saudáveis e investigar a viabilidade da quimioluminescência e do kit de reagentes desenvolvido para a espécie humana como ferramenta neste processo. Numa primeira etapa avaliou-se o soro de 100 cadelas saudáveis, de raças e idades variadas. Numa segunda etapa o soro de 10 cadelas saudáveis foi submetido ao processo de concentração de proteínas e posteriormente avaliado. Nas amostras não concentradas os níveis do marcador ficaram abaixo do limiar de detecção do kit. Nas amostras concentradas, o valor médio e respectivo desvio padrão observados foram  $0,4140 \pm 0,25$  U/mL nas amostras com o dobro da concentração inicial e  $0,5170 \pm 0,25$  U/mL nas amostras quatro vezes mais concentradas. Com base nos resultados obtidos neste estudo concluiu-se que o método empregado, ensaio imunoluminométrico por quimioluminescência e o kit de reagentes desenvolvido para a detecção do CA 15.3 na espécie humana mostram-se viáveis para utilização na espécie canina, necessitando entretanto de adequação da técnica.

**Palavras-Chave:** antígenos tumorais, cães, MUC1, neoplasia mamária, quimioluminescência.

## **QUANTIFICATION OF SERUM TUMOR MARKER CA 15.3 IN FEMALE DOGS HEALTHY BY CHEMILUMINESCENCE**

**SUMMARY** – Given the high incidence of mammary tumors and metastases in female dogs and trying to contribute with the veterinary oncology in standardization of a simple, effective and affordable technique in the early diagnosis of these metastases, this study was aimed to evaluate the tumor marker CA 15.3 in serum of healthy dogs and to investigate the feasibility and the chemiluminescence reagent kit designed for the human species as a tool in this process. In a first step we evaluated the serum of 100 healthy female dogs of different breeds and ages. In a second step, the serum of 10 healthy female dogs was subjected to the process of proteins concentration and subsequently evaluated. In samples not concentrated, the levels were below the detection of the kit. In concentrated samples, the average value and its standard deviation observed were  $0.4140 \pm 0.25$  U/mL in the samples with at double the initial concentration, and  $0.5170 \pm 0.25$  U/mL in samples four times more concentrated. Based on the results of this study it is concluded that the method employed, chemiluminescent immunoluminometric assay, and the reagents kit designed for detection of the CA 15.3 in humans appear to be viable for use in dogs, however requiring adjustment of the technique.

**Keywords:** breast cancer, chemiluminescence, dogs, MUC1, tumor antigens

## I. INTRODUÇÃO

Na espécie canina as neoplasias constituem uma das principais causas de morte, sendo que em cadelas as mamárias representam 45,64% da totalidade dos tumores diagnosticados e aproximadamente 70% deles apresentam caráter maligno. Portadores dessa afecção encontram-se em situação de risco para o desenvolvimento de metástases, mesmo após longos períodos de remissão.

Estudos têm demonstrado que as células neoplásicas do tumor de mama migram precocemente para a circulação e que o tempo envolvido na detecção dessas células está diretamente relacionado ao prognóstico da doença.

Em seres humanos, os marcadores tumorais têm se mostrado eficientes na detecção precoce dessas células, auxiliando no diagnóstico de recidivas e no acompanhamento dos pacientes.

O antígeno CA 15.3, glicoproteína de alto peso molecular, é atualmente considerado o marcador tumoral mais sensível no acompanhamento de mulheres com câncer de mama, principalmente na detecção de metástases, antes mesmo do surgimento de manifestações clínicas.

Dentre os métodos disponíveis para a determinação do CA 15.3, as técnicas automatizadas de imunoensaio vêm ganhando destaque por acrescentar precisão e velocidade na produção dos resultados.

Partindo de uma delimitação bibliográfica preliminar, poucas referências à utilização do marcador tumoral CA 15.3 na espécie canina foram encontradas e os poucos dados disponíveis não se mostraram suficientemente seguros para conclusões sobre a utilização do referido marcador na clínica oncológica dos caninos.

Considerando os argumentos apresentados, este ensaio foi idealizado com o intuito de pesquisar os níveis séricos do marcador tumoral CA 15.3 em cadelas saudáveis, testar a eficiência e a viabilidade do método de quimioluminescência e finalmente verificar a possibilidade de aplicação na espécie canina do kit de reagentes desenvolvido para a detecção do CA 15.3 na espécie humana. Contribuindo, dessa

forma, para a determinação de um protocolo simples e acessível no diagnóstico precoce de metástases de tumor de mama em cadelas.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

O termo neoplasia significa “novo crescimento” e define-se como uma perturbação do crescimento celular em que ocorre alteração permanente e hereditária nas células. Dessa alteração resulta proliferação celular anormal excessiva, intencional e não autônoma, que continua indefinidamente apesar dos estímulos ou efeitos da neoplasia em crescimento sobre os tecidos adjacentes. Em geral, é durante a fase de progressão tumoral que a maioria das células adquire um fenótipo mais agressivo, invadindo tecidos adjacentes e formando metástases, as quais caracterizam as neoplasias malignas (RODASKI & PIEKARS, 2009).

De todos os tumores observados nos animais domésticos de pequeno porte, as neoplasias mamárias apresentam maior incidência, particularmente em cadelas (MARTINS & FERREIRA, 2003). Estudos realizados por De Nardi et al. (2002) demonstram que, dentre os tumores avaliados em cadelas, 45,64% eram mamários e 68,4% deles apresentavam características malignas. Observaram também maior incidência em fêmeas com idade entre sete e 12 anos. De fato, segundo Mialot (1988), a ocorrência de tumores de mama em cadelas jovens é rara, observando-se significativo aumento de incidência a partir dos oito anos de idade.

Considerada multifatorial, a etiologia das neoplasias mamárias está relacionada com fatores genéticos, ambientais, nutricionais e principalmente hormonais (PERSSON, 2000; SILVA et al., 2004).

A influência hormonal tem sido evidenciada pelos elevados níveis de receptores para os hormônios estrógeno e progesterona nesses tumores (LANA et al., 2007; SARTIN et al., 1992). Esses hormônios atuam sobre as glândulas mamárias dos carnívoros domésticos durante toda a vida, uma vez que as fêmeas não apresentam menopausa (ZUCCARI et al., 2001). A fase hormonal em que as fêmeas são submetidas à ovariectomia também influencia diretamente no risco de desenvolver a doença. Fêmeas submetidas a esse procedimento antes do primeiro estro apresentam risco de 0,05%, o qual aumenta para 8% quando a

ovariohisterectomia ocorre após o primeiro estro e chega a 26% após o segundo (DALECK, 1996; SCHNEIDER et al., 1969).

A participação de fatores nutricionais é evidenciada ao observar-se que cadelas que se tornam obesas até o primeiro ano de vida estão predispostas a desenvolver tumor mamário. A utilização de dietas inadequadas provoca não apenas aumento no depósito de gordura no tecido subcutâneo, mas também aumento nas taxas de conversão de hormônios andrógenos em estrógenos. (PELETEIRO, 1994; PEREZ et al., 1998; PINOTTI & TEIXEIRA, 2000; SOREMNO, 1998).

Segundo Edwards et al. (2005), portadores de neoplasia mamária encontram-se em situação de risco para o desenvolvimento de metástases, mesmo após longos períodos de remissão. Mialot (1988) ressalta que 25% a 50% dos tumores mamários malignos produzem metástases em um ano após a remoção cirúrgica, sendo que a sobrevivência dos animais acometidos pode variar, dependendo do tipo neoplásico, de algumas semanas a dois anos após a detecção do processo. Os órgãos mais afetados pela disseminação tumoral são os pulmões e linfonodos, mas pode também ocorrer no fígado, coração, rins, pele, cérebro e ossos (KITCHELL, 1995).

A drenagem linfática dos tumores mamários caninos é complexa, tendo sido demonstrado que podem existir comunicações linfáticas entre as cadeias mamárias direita e esquerda e entre glândulas adjacentes de uma mesma cadeia, na direção cranial e caudal. A existência de comunicações linfáticas inconstantes parece contribuir para que as metástases linfáticas possam ocorrer sem respeitar o sentido habitual da corrente linfática (QUEIROGA & LOPES, 2002).

Estudos têm demonstrado que as células neoplásicas do tumor de mama começam a migrar para a circulação nos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral. Aproveitar essa característica é fundamental, uma vez que o tempo envolvido na detecção das células tumorais pode ter implicações importantes no prognóstico da doença (GAFORIO et al., 2003).

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

## **Marcadores tumorais**

Marcadores tumorais são macromoléculas associadas às neoplasias que podem ser quantificadas por métodos bioquímicos, imunológicos, morfométricos, ultraestruturais e moleculares nos fluidos ou nos tecidos corporais (CAPELOZZI, 2001). Em sua maioria, marcadores são proteínas e pequenos peptídeos (ALMEIDA, 2004), incluindo antígenos de superfície celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormônios (MATOS et al., 2005).

Marcadores tumorais séricos são aqueles detectados no sangue periférico de pacientes com câncer e constituem um recurso ideal para a detecção de células tumorais disseminadas, devido à facilidade de acesso ao material a ser analisado (ZIDMAN, 1961).

Entre suas aplicações está o manejo clínico de pacientes com câncer, auxiliando no diagnóstico, estadiamento, avaliação da resposta terapêutica, detecção de recidivas e prognóstico (ALONSO, 2005; MATOS et al., 2005; SILVEIRA, 2005).

Um marcador ideal deve ser uma substância produzida por células tumorais e disseminada para os fluidos corpóreos, onde pode ser quantificada de preferência por métodos não invasivos de diagnóstico. Além disso, deve estar presente apenas em pacientes com câncer e sua expressão deve estar aumentada proporcionalmente ao grau de malignidade do tumor, refletindo o estágio da doença (SOUZA, 2002). Embora nenhum marcador tumoral apresente todas as características preconizadas, o estudo dessas moléculas tem contribuído para a melhor compreensão da fisiopatologia da progressão tumoral, com crescente aplicação clínica (CHAMMAS et al., 1999).

Os principais grupos de marcadores tumorais empregados na prática clínica são hormônios, antígenos oncofetais, isoenzimas, proteínas específicas, mucinas e outras glicoproteínas (BAYNES, 2000).

As mucinas constituem uma família de glicoproteínas de peso molecular elevado que contêm numerosas cadeias laterais de carboidratos. Em condições tumorais, a expressão das enzimas que sintetizam estas cadeias carboidratadas encontra-se alterada, o que dá lugar ao aparecimento de epítomos distintos de um antígeno comum (RIVERA, 1997).



Entre 1975 e a década de oitenta, o uso de anticorpos monoclonais facilitou o descobrimento de uma gama de novos marcadores tumorais, como as glicoproteínas das famílias MUC1 (CA 15.3 e CA 19.9) e MUC 16 (CA 125), relacionadas aos carcinomas de ovário e mama na espécie humana, e amplamente estudadas até os dias atuais (GION et al., 1999; DIAMANDIS et al., 2002).

Diversos estudos têm demonstrado que anticorpos contra antígenos humanos, disponíveis comercialmente, podem ser usados para o reconhecimento de epítomos em tumores de cães e gatos (THOOLEN et al., 1992).

### **CA 15.3**

Antígeno circulante associado ao câncer de mama, o CA 15.3 é uma glicoproteína mucina de alto peso molecular (300-450 kd), produzida pelas células epiteliais glandulares e identificado por dois anticorpos monoclonais: 115D8 (anticorpo contra membrana de globulina da gordura do leite) e DF3 (anticorpo contra extratos purificados de uma fração isolada de membrana originária de carcinoma mamário) (DUFFY, 1999; SCHWARTZ, 1993).

O CA 15.3 é produzido em pequenas quantidades pelas células epiteliais normais de mama (KESHAVIAH et al., 2007) e superexpresso por uma variedade de adenocarcinomas, especialmente os relacionados ao câncer de mama (SOUZA, 2002). O valor de referência utilizado para mulheres é 25 U/mL, sendo que apenas 1,3% da população sadia apresenta níveis elevados (TOUITOU et al., 1998).

O CA 15.3 é o marcador tumoral sérico mais indicado para o monitoramento do câncer de mama (CLINTON et al., 2003; GERAGHTY et al., 1992; FUJINO et al., 1986; SAFI et al., 1989; WOJTACKI et al., 2001). Utilizado principalmente no diagnóstico precoce de recidivas e metástases, suas alterações podem preceder os sinais clínicos em até 13 meses (BENSOUDA et al., 2009; KALLIONIEMI et al., 1988). O marcador tumoral CA 15.3 pode também ser empregado no monitoramento dos pacientes durante o tratamento (MOLINA et al., 2005; MUMTAZ et al., 2006).

Estudos em seres humanos indicam que os níveis séricos do CA 15.3 variam de acordo com o estadiamento clínico (GUIMARÃES et al., 2002). Aumento superior a 25% em sua concentração correlaciona-se com a progressão da doença em 80% a 90% dos casos e sua diminuição está associada à regressão em 70% a 80% dos casos (ALMEIDA, 2004). Além disso, níveis séricos muito elevados estão associados à pior sobrevida (SILVEIRA, 2005).

Segundo Gion et al. (1999), o marcador tumoral CA 15.3 apresenta especificidade e sensibilidade inferior ao CA 27.29 na detecção dos estágios iniciais das neoplasias mamárias. Entretanto, alguns estudos preliminares demonstraram que ambos os marcadores apresentam desempenho semelhante quando utilizados no diagnóstico de metástases e monitoramento da doença em estágio avançado (BON et al., 1997; DNISTRAN et al., 1996; HOU et al. 1999). Quando comparado ao antígeno carcinoembrionário (CEA), o CA 15.3 apresenta maior sensibilidade e especificidade (TONDINI et al., 1988).

Wojtacki et al. (2001) avaliaram os níveis séricos do CA 15.3 em 733 mulheres com carcinoma mamário e puderam comprovar a eficiência desse marcador no diagnóstico precoce da doença mamária metastática, bem como a alta sensibilidade do método na detecção de metástases ósseas (100% em pacientes com diagnóstico cintilográfico com duas ou mais lesões metastáticas).

Na espécie canina, Marchesi et al. (2007) sugerem que a investigação dos níveis séricos de CA 15.3 pode ser promissora no diagnóstico do tumor mamário. No entanto, eles relatam a escassez de valores de referência desse marcador na literatura.

Em seus estudos, Jardini (2003) não detectou a presença do marcador tumoral CA 15.3 no soro de cadelas saudáveis e portadoras de neoplasia mamária. Entretanto, Campos (2010, p.49) avaliou os níveis séricos do CA 15.3 em grupos de cadelas saudáveis e portadoras de tumor mamário, com e sem metástase, e relata uma “possível correlação entre o marcador tumoral sérico CA15.3 e o estadiamento do câncer de mama em cadelas”.

Em geral, os marcadores tumorais ocorrem em baixas concentrações nos líquidos orgânicos e necessitam de métodos sensíveis para sua identificação (SOUZA,

2002). Os primeiros ensaios utilizados na detecção do CA 15.3 eram manuais. Mais tarde tornaram-se disponíveis ensaios imunoenzimáticos e recentemente os imunoenaios automatizados vieram acrescentar velocidade e precisão aos resultados (HUBER et. al., 1996).

### **Ensaio Imunoluminométrico**

Quimioluminescência é um imunoensaio “sandwich” empregado na captura e detecção de antígenos. A técnica está baseada na geração de uma grande quantidade de energia, que é dissipada na forma de fótons, sendo então detectada e quantificada através de um fotomultiplicador automático, denominado luminômetro. Como o processo não requer a absorção prévia de luz, as medidas de emissão de quimioluminescência são feitas contra um baixo “background”, o que potencialmente permite uma grande sensibilidade de detecção (PORTELA, 1999).

A glicoproteína mucinógena CA 15.3 apresenta um distinto epítopo identificado por dois anticorpos monoclonais (MAbs), o 115D8 e o DF3 (HILKENS et al., 1984; KUFÉ et al., 1984), sendo que o 115D8 funciona como anticorpo de captação, enquanto o DF3 funciona como anticorpo de detecção. O uso de anticorpos monoclonais melhora significativamente a especificidade dos testes, pois estes reconhecem somente um epítopo na superfície da célula tumoral, evitando reações cruzadas (WU & NAKAMURA, 1997).

Em seus estudos, Marchesi et al. (2007) e Marchesi et al. (2010) sugerem que a quimioluminescência é uma técnica sensível, simples de realizar e de baixo custo, e que o kit de reagentes desenvolvido para a espécie humana pode ser promissor na determinação dos níveis séricos de CA 15.3 para o diagnóstico do tumor mamário em cadelas.

### **III. OBJETIVOS**

#### **Geral**

O presente ensaio tem como escopo principal avaliar os níveis séricos do marcador tumoral CA 15.3 em cadelas sadias adultas (a partir de 18 meses de idade).

#### **Específicos**

- Quantificar as concentrações séricas do marcador tumoral CA 15.3 em cadelas saudáveis;
- Testar a viabilidade do método de quimioluminescência na detecção do marcador tumoral CA 15.3 na espécie canina;
- Verificar a possibilidade de aplicação na espécie canina do kit de reagentes desenvolvido para a detecção do CA 15.3 na espécie humana.

## **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

### **Aspectos éticos**

Este trabalho de pesquisa está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob protocolo de nº 013595/10.

### **Primeira etapa**

#### *Grupos experimentais*

Para este estudo foram avaliadas 100 fêmeas da espécie canina, híginas, de raças variadas, com idade entre 2 e 12 anos, selecionadas em clínicas particulares e canis da região de Jaboticabal, SP.

### **Avaliação clínica**

Os animais experimentais foram previamente avaliados através de:

- anamnese criteriosa;
- exames físicos, abrangendo os sistemas cardiorespiratório, gastrointestinal, neurolocomotor e urogenital;
- exames clinicopatológicos:
  - hemograma;
  - função renal (determinação de creatinina e ureia séricas);
  - função hepática (determinação de alanino aminotransferase, proteína total, albumina e fosfatase alcalina séricas).

### **Obtenção das amostras de sangue**

As amostras foram obtidas por venipunção jugular e envasadas em tubos de vidro siliconizados providos de rolha de borracha (Vacutainer® Becton Dickinson), divididas da seguinte forma:

- tubos com anticoagulante (a 15% de EDTA-k3): para realização do hemograma.
- tubos sem anticoagulante: para a dosagem do CA 15.3 e funções hepática e renal.

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixa térmica e encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, onde os exames foram realizados num período máximo de oito horas após a coleta.

### ***Processamento das amostras***

As amostras de sangue sem anticoagulante, destinadas às dosagens bioquímicas e do CA 15.3 foram centrifugadas imediatamente. O soro obtido foi separado em três alíquotas, sendo uma utilizada para as dosagens bioquímicas e duas devidamente envasadas em criotubos, identificadas e estocadas a -20°C por um período de 60 dias. As amostras foram então acondicionadas em gelo seco e transportadas para o Centro de Diagnósticos ITULAB, em Itu/SP, onde foram realizadas as dosagens do CA 15.3.

### ***Análises Laboratoriais para seleção das parcelas experimentais***

#### ***Hemograma***

As contagens globais de hemácias, leucócitos e plaquetas, a taxa de hemoglobina, o volume globular ou hematócrito, o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram obtidos com o auxílio de um contador automático de células (ABC Vet – HORIBA ABX – São Paulo/Brasil). A contagem diferencial dos leucócitos foi obtida utilizando-se de esfregaços sanguíneos corados com uma mistura de Metanol, May-Grunwald e Giemsa. A fórmula leucocitária absoluta foi obtida a partir das contagens global e diferencial das células leucocitárias, por uma regra de três direta.

### *Bioquímica Sérica*

A determinação da alanina aminotransferase foi realizada pelo método cinético – UV, a fosfatase alcalina pelo método cinético, a ureia pelo método enzimático – UV e a creatinina pelo método colorimétrico, sendo as leituras realizadas em aparelho semiautomático (LABQUEST).

A determinação da proteína total foi realizada pelo método colorimétrico-biureto e a determinação da albumina pelo método colorimétrico, ambas em aparelho semiautomático (LABQUEST).

### ***Avaliação quantitativa do CA 15.3***

O método empregado foi o imunoenensaio de quimioluminescência em *sandwich*, utilizando o kit de reagentes LIAISON® CA 15.3 e o Analisador LIAISON®.

#### *Princípios do teste (técnica de sandwich)*

Neste ensaio são utilizados dois anticorpos monoclonais altamente específicos:

- 115D8: anticorpo de captura, responsável pela união da fase sólida (partículas magnéticas) com o conjugado.
- DF3: anticorpo detector, ou conjugado, é marcado por um derivado do isoluminol.

Durante a primeira incubação, o antígeno presente na amostra (CA 15.3) liga-se ao anticorpo monoclonal de fase sólida. Em seguida, uma primeira lavagem elimina o material não ligado. Durante a segunda incubação, o conjugado reage com o CA 15.3, que se encontra ligado à fase sólida. O material não ligado é removido mediante um ciclo de lavagem, e então, a concentração de CA 15.3 é determinada por uma reação de quimioluminescência. O sinal luminoso é medido por um fotomultiplicador, em unidades relativas de luz (RLU), sendo proporcional à quantidade de CA 15.3 presente na amostra, e os resultados são expressos em U/mL.

## **Segunda etapa**

### ***Grupos experimentais***

Nesta etapa foram avaliadas 10 fêmeas escolhidas entre as anteriormente avaliadas.

### ***Obtenção das amostras***

As amostras de sangue foram obtidas por venipunção jugular, envasadas em tubos de vidro siliconizados providos de rolha de borracha (Vacutainer® Becton Dickinson) sem anticoagulante, acondicionadas em caixa térmica e encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

### ***Processamento das amostras***

Conforme demonstrado na Figura 1, as amostras foram centrifugadas e 4 mL do soro obtido de cada amostra foram transferidos para tubos concentradores de proteínas (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Device). Os tubos foram centrifugados a 25°C, 3.800 rpm / 25 minutos, numa centrífuga refrigerada (Excelsa®4 modelo 280-R FANEM). Nessas condições, obteve-se 2 mL de soro com o dobro da concentração inicial. Alíquotas de 0,5 mL foram separadas, envasadas em criotubos e congeladas a -20°C (primeira concentração). O volume de soro restante foi novamente submetido a centrifugação, a 25°C, 3.800 rpm / 5 minutos, produzindo amostras 4 vezes mais concentradas que as iniciais, as quais foram envasadas em criotubos e congeladas a -20°C (segunda concentração).

As amostras estocadas foram devidamente acondicionadas em gelo seco e transportadas para o Centro de Diagnósticos ITULAB, em Itu/SP, onde foram realizadas as dosagens do CA 15.3, da mesma forma que na primeira etapa deste estudo.



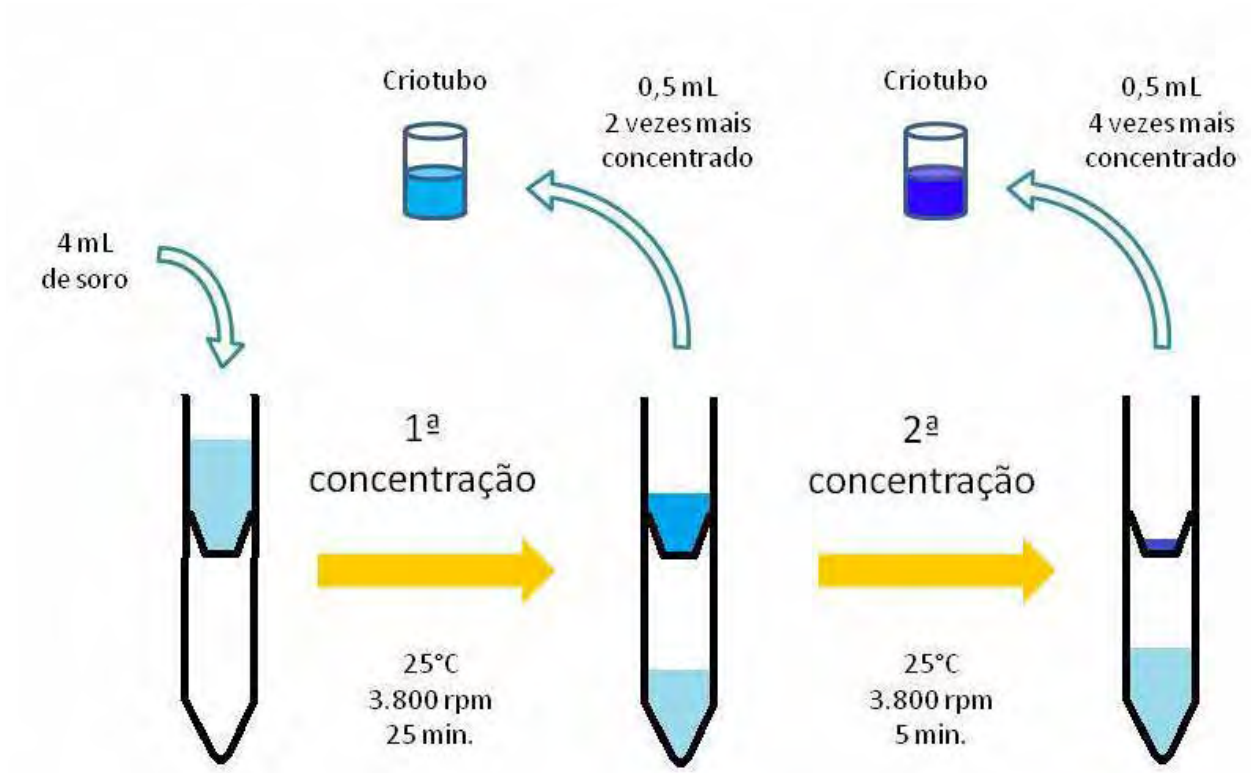


Figura 1. Esquema detalhando o processo de concentração das amostras de soro.

### **Análise Estatística**

Para cada variável observada no experimento foram apresentadas as estatísticas descritivas de média, variância, desvio padrão e erro padrão da média. Na análise de variância utilizou-se o teste de F e a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5%. Sempre que necessário considerou-se o nível de significância de 0,05.

## V. RESULTADOS

Durante a primeira fase do experimento, quando 100 amostras de soro foram avaliadas, não foi possível detectar a presença do CA 15.3. Todas as amostras apresentaram resultado  $< 0,3$  U/mL (limiar de detecção do teste). Entretanto, ao avaliar as amostras da segunda fase do experimento, que passaram pelo processo de concentração de proteínas, o CA 15.3 foi detectado em 60% das amostras após a primeira concentração e 70% após a segunda concentração. Os valores estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores séricos individuais de CA 15.3 encontrados na Segunda Etapa do experimento, após as amostras de soro passarem por processo de concentração de proteínas. Jaboticabal/SP, 2012

<b>Nº da amostra</b>	<b>Valor sérico de CA 15.3 após 1ª concentração (U/mL)</b>	<b>Valor sérico de CA 15.3 após 2ª concentração (U/mL)</b>
1	$< 0,3$	0,74
2	0,66	0,84
3	0,53	$< 0,3$
4	$< 0,3$	$< 0,3$
5	0,64	0,66
6	$< 0,3$	1,11
7	$< 0,3$	$< 0,3$
8	0,58	0,73
9	0,73	0,51
10	1	0,58

A referida tabela demonstra que os valores obtidos na análise individual das parcelas experimentais variaram entre  $<0,3$  e 1 U/mL na primeira concentração e entre  $<0,3$  e 1,11 U/mL na segunda concentração.

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos na análise estatística descritiva de média, variância, desvio padrão e erro padrão da média. Através da análise de variância observa-se que os valores médios obtidos não apresentaram diferença significativa entre as duas concentrações, visto que  $p > 0,05$ .

Tabela 2. Valores médios e resultados obtidos na análise de variância para valores séricos. Jaboticabal/SP, 2012.

<b>Tratamento</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>EPM**</b>
1ª concentração (2x)	0,4140	0,06207250	0,24914353	0,07878610
2ª concentração (4x)	0,5170	0,06207250	0,24914353	0,07878610
Teste F	0,4300 NS*			
DMS (Tukey, 5%)	0,3565			

\* não significativo

\*\* erro padrão da média

## VI. DISCUSSÃO

A condução desse trabalho justifica-se devido à alta incidência de neoplasias mamárias e metástases em cadelas (DE NARDI, 2002; MIALOT, 1988).

Embora o marcador tumoral CA 15.3 seja amplamente estudado em medicina humana desde a década de 80 e continue sendo o marcador de eleição para diagnóstico precoce de metástases de tumor mamário em mulheres, poucas referências existem no que se refere à medicina veterinária.

Ao pesquisar o marcador tumoral sérico CA 15.3 em cadelas saudáveis e portadoras de neoplasia mamária, Marchesi et al. (2007) relatam a escassez de valores de referência deste marcador na literatura, fato evidenciado no transcorrer deste experimento.

Este estudo foi idealizado com o intuito de avaliar os níveis séricos do CA 15.3 em cadelas saudáveis pelo método de quimioluminescência, através do kit de reagentes desenvolvido para uso na espécie humana, na busca de uma técnica simples, não invasiva e acessível para a detecção de metástases de tumor mamário na espécie canina.

As primeiras 100 amostras avaliadas apresentaram valores inferiores ao limiar de detecção do método. Estes resultados nos levaram a questionar a possibilidade de não existir reação entre os antígenos caninos e os anticorpos usados para a detecção do CA 15.3 em humanos. A partir desse ponto, o desafio foi comprovar a existência dessa reação, como outros autores já haviam relatado.

As 10 amostras submetidas ao processo de concentração de proteínas apresentaram valores de  $0,41 \pm 0,25$  U/mL quando a concentração foi duplicada e  $0,51 \pm 0,25$  U/mL quando a concentração foi quadruplicada. Os resultados obtidos neste estudo apresentaram-se em concordância com os dados apresentados por Marchesi et al.(2010) que foram  $0,57 \pm 0,21$  U/mL.

Ao avaliar a presença do CA 15.3 no soro de cadelas saudáveis e portadoras de neoplasia mamária, utilizando-se do imunoensaio por quimioluminescência, Jardini

(2003) não obteve resultados, o que pode ser explicado pelos valores séricos estarem abaixo do limiar de detecção do método, fato que se apresenta em conformidade aos valores evidenciados na primeira fase deste experimento.

Campos (2010) utilizou-se do ensaio ELISA para quantificar o CA 15.3 sérico em cadelas híginas e portadoras de neoplasia mamária. As cadelas saudáveis apresentaram valores de  $1,37 \pm 0,46$  ng/mL, diferindo dos dados obtidos neste trabalho, aparentemente devido à diferença entre as metodologias utilizadas.

Embora Marchesi et al. (2010) concluam em seus estudos que o uso da quimioluminescência e os kits usados em medicina possam ser promissores para a determinação dos níveis de CA 15.3 no diagnóstico oncológico de mama canino, os níveis séricos do CA 15.3 encontrados no atual estudo foram inferiores ao limiar de detecção desses kits, indicando a necessidade de adequação da técnica utilizada.

Um fato interessante a ser destacado foi a obtenção de valores incoerentes entre as diferentes concentrações. Ao se observar os dados demonstrados na tabela 1 podemos constatar que algumas amostras (ex: amostra 3, 9 e 10) apresentam valores decrescentes entre a primeira e segunda concentração. Uma possível justificativa para esse fato seria uma falha na coleta do soro já concentrado. Depois de ser centrifugada, a amostra era transportada do tubo concentrador para o criotubo através de uma pipeta. Nessa fase, o fabricante do tubo concentrador sugere que o soro seja coletado utilizando a pipeta em movimentos circulares, na tentativa de se evitar a perda de proteínas por adesão na membrana de celulose. Uma falha nesse processo poderia justificar os valores encontrados nas amostras citadas anteriormente.

Ao descrever a técnica usada em seus estudos, Marchesi et al. (2007) usam o termo "potentiated chemiluminescence method". Embora não descrevam com detalhes a técnica utilizada, a proximidade entre os valores encontrados por esses autores e os valores encontrados neste estudo nos levam a concluir que um possível caminho para a utilização da quimioluminescência seja a concentração das amostras. Contudo, acredita-se que novas formas para a realização dessa concentração devam ser estudadas, a fim de se aprimorar a técnica.

## VII. CONCLUSÕES

Nas condições testadas no presente estudo, pode se concluir que:

- As concentrações séricas do CA 15.3 nas 100 primeiras amostras avaliadas estavam abaixo do limiar de detecção da metodologia empregada. Nas 10 amostras previamente concentradas, os valores médios observados foram  $0,41 \pm 0,25$  U/mL quando a concentração foi duplicada e  $0,51 \pm 0,25$  U/mL quando a concentração foi quadruplicada.
- Através da análise de variância verificou-se que as concentrações séricas avaliadas não apresentaram diferença significativa.
- O método empregado – ensaio imunoluminométrico por quimioluminescência – mostrou-se viável na detecção do marcador tumoral CA 15.3 na espécie canina.
- O kit de reagentes desenvolvido para a detecção do CA 15.3 na espécie humana mostrou-se viável para utilização na espécie canina.
- Foi necessário adequação da técnica, através da concentração de proteínas das amostras avaliadas, a fim de se alcançar valores compatíveis com o limiar de detecção do kit utilizado.

## VIII. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. C. **Farmacêuticos em oncologia**: uma nova realidade. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 61-72.

ALONZO, T. A. Standards for reporting prognostic tumor marker studies. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 23, n. 36, p. 9053-9054, 2005.

BAYNES, J.; DOMINICZAC, M. H. **Bioquímica médica**. São Paulo: Manole, 2000.

BENSOUDA, Y.; ANDRÉ, F.; BOULET, T.; AL-GHUZLAN, A.; CONFORTI, R.; TROALEN, F.; BOURGIER, C.; ERRIHANI, H.; SPIELMANN, M.; DELALOGUE, S. Prevalence of elevated serum CA 15-3 at time of metastatic relapse of breast cancer and correlation with hormone receptor status. **Bulletin du Cancer**, Paris, v. 96, n. 10, p. 923-928, 2009.

BON, G. S.; VON MENSENDORFF-POUILLY, S.; KENEMANS, P.; VAN KAMP, G. J.; VERSTRAETEN, R. A.; HILGERS, J. Clinical and technical evaluation of ACS BR serum assay of MUC1 gene-derived glycoprotein in breast cancer and comparison with CA 15-3 assay. **Clinical Chemistry**, Washington, DC, v. 43, n. 4, p. 585-593, 1997.

CAMPOS, L. C. **Avaliação de marcadores tumorais séricos em cadelas com e sem metástase em câncer de mama**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

CAPELOZZI, V. L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. **Jornal de Pneumologia**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 321-328, 2001.

CHAMMAS, R.; SONNEBUR, J. L.; WATSON, N. E.; TAI, T.; FARQUHAR, M. G.; VARKI, N. M.; VARKI, A. De-N-acetyl-gangliosides in humans: unusual subcellular distribution of a novel tumor antigen. **Cancer Research**, Baltimore, v. 59, n. 6, p. 1337-1346, 1999.

CLINTON, S. R.; BEASON, K. L.; BRYANT, S.; JOHNSON, J. T.; JACKSON, M.; WILSON, C.; HOLIFIELD, K.; VINCENT, C.; HALL, M. A comparative study of four serological tumor markers for the detection of breast cancer. **Biomedical Sciences Instrumentation**, New York, v. 39, p. 408-414, 2003.

DALECK, C. R. Tumor mamário canino. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 1, n. 2, p.12-14, 1996.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHIERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 15-26, 2002.

DIAMANDIS, E. P.; FRITSCHKE, H. A.; LILJA, H.; CHAN, D. W.; SCHWATZ, M. K. Tumor markers: physiology, pathobiology, technology, and clinical applications. Washington. **AACC Press**, 2002. p. 3-8.

DNISTRIAN, A. M.; SCHUARTZ, M. K.; GREENBERG, E. J.; SMITH, C. A.; SCHUARTZ, D. C.; MAIMONIS, P. Evaluation of a breast cancer antigen assayed on the Ciba Corning ACS:180(R) Automated Chemiluminescence System. **Journal of Tumour Marker Oncology**, Vienna, v.11, n. 3, p.5-10, 1996.

DUFFY, M. J. CA15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer. **Annals of Clinical Biochemistry**, London, v. 36, p. 579-586, 1999.



EDWARDS, B. K.; BROWN, M. L.; WINGO, P. A.; HOWE, H. L.; WARD, E.; RIES, L. A.; SCHRAG, D.; JAMISON, P. M.; JEMAL, A.; WU, X. C.; FRIEDMAN, C.; HARLAN, L.; WARREN, J.; ANDERSON, R. N.; PICKLE, L. W. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 97, n.19, p. 1407-1427, 2005.

FUJINO, N.; HAGA, Y. ; SAKAMOTO, K.; EGAMI, H. ; KIMURA, M.; NISHIMURA, R.; AKAGI, M. Clinical Evaluation of an Immunoradiometric Assay for CA15-3 Antigen Associated With Human Mammary Carcinomas: Comparison With Carcinoembryonic Antigen. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, Tokyo, v. 16, n. 4, p. 335-346, 1986.

GAFORIO, J. J.; SERRANO M. J.; SANCHEZ-ROVIRA, P.; SIRVENT, A.; DELGADO-RODRIGUEZ, M.; CAMPOS, M.; De LA TORRE, N.; ALGARRA, I.; DUENAS, R.; LOZANO, A. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. **International Journal of Cancer**, New York, v. 107, n. 6, p. 984-990, 2003.

GERAGHTY, J. G.; COVENEY, E. C.; SHERRY, F.; O'HIGGINS, N. J.; DUFFY, M. J. CA 15-3 in patients with locoregional and metastatic breast carcinoma. **Cancer**, Philadelphia, v. 70, n. 12, p. 2831-2834, 1992.

GION, M.; DAIDONE, M. G. Circulating biomarkers from tumour bulk to tumour machinery: promises and pitfalls. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 40, n. 17, p. 2613- 2622, 2004.

GION, M.; MIONE, R.; LEON, A. E.; DITTADI, R. Comparison of the diagnostic accuracy of CA27.29 and CA15.3 in primary breast cancer. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 45, n. 5, p. 630-637, 1999.

GUIMARÃES, R. C.; RODRIGUES, V. H.; PÁDUA, C. A. J.; ANDRADE, F. A. F. Uso dos marcadores tumorais na prática clínica. **Prática Hospitalar**, Belo Horizonte, v. 4, n. 23, p. 1-8, 2002.

HILKENS, J.; BUIJS, F.; HILGERS, J.; HAGEMAN, P.; CALAFAT, J.; SONNENBERG, A.; VAN DER VALK, M. Monoclonal antibodies against human milk fat globule detecting differentiating antigens of the mammary gland and its tumours. **International Journal of Cancer**, New York, v. 34, p. 197-206, 1984.

HOU, M. F.; CHEN, Y. L.; TSENG, T. F.; LIN, C. M.; CHEN, M. S.; HUANG, C. J.; HUANG, Y. S.; HSIEH, J. S.; HUANG, T. J.; JONG, S. B.; HUANG, Y. F. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, Taiwan, v. 15, n. 9, p. 520-528, 1999.

HUBER, P. R.; BISCHOF, P.; KRETSCHMER, R.; TRUSCHNIG, M.; HALWACHS, G.; SCHMIDT, M. CA 15-3: a multicenter evaluation of automated and manual tests. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, Berlin, v. 34, p. 77-84, 1996.

JARDINI, F. H. M. **Avaliação dos marcadores tumorais CEA e CA 15.3 no soro e CEA no tumor e linfonodo excisados de cadelas portadoras de neoplasia mamária**. 2003. 50 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

KALLIONIEMI, O. P.; OKASA, H.; AARAN, R. K.; HIETANEN, T.; LEHTINEN, M.; KOIVULA, T. Serum CA 15-3 assay in the diagnosis and follow-up of breast cancer. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v. 58, n. 2, p. 213-215, 1988.

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

KITCHELL, B. E. Mammary tumors. In: BONAGURA, J. D. **Kirk's current veterinary therapy XII: small animal practice**. 12<sup>th</sup>. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. p. 1098-1103.

KUFE, D.; INGHIRAMI, G.; ABE, M.; HAYES, D.; JUSTI-WHELLER, H.; SCHLOM, J. Differentiated reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumours. **Hybridoma**, Larchmont, v. 3, n. 3, p. 223-232, 1984.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. 4<sup>th</sup>. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. p. 619-636.

MARCHESI, M. C.; CONTI, M. B.; PIERAMATI, C.; MANGILI, V.; FRUGANTI, G. Assessment and Behavior of Alphafetoprotein (AFP), Antigen Cancer 15/3 (CA 15/3), Carcinebryonal Antigen (CEA) in Clinical Oncology of the Dog: Preliminary Study. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 31, n. 1, p. 301-304, 2007.

MARCHESI, M. C.; MANUALI, E.; PACIFICO, E.; FERRI, C.; ROMAGNOLI, M.; MANGILI, V.; FRUGANTI, G. Cancer antigen 15/3: possible diagnostic use in veterinary clinical oncology. Preliminary study. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. S103-S106, 2010.

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

MATOS, L. L.; MACHADO, L. N.; SUGIYAMA, M. M.; BOZZETTI, R. M; PINHAL, M. A. S. Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais. **Arquivos Médicos do ABC**, Santo André, v. 30, n. 1, p. 19-25, 2005.

MIALOT, J. P. Tumores Mamários da Cadela. In: \_\_\_\_\_. **Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos**. Porto Alegre: A Hora Veterinária, 1998. p. 131-138.

MOLINA, R.; BARAK, V.; VAN DALEN, A.; DUFFY, M. J.; EINARSSON, R.; GION, M.; GOIKE, H.; LAMERZ, R.; NAP, M.; SÖLÉTORMOS, G.; STIEBER, P. Tumor Markers in Breast Cancer - European Group on Tumor Markers Recommendations. **Tumor Biology**, Basel, v. 26, n. 6, p. 281-293, 2005.

MUMTAZ, B.; RUKHASHAN, K.; GHAZALA, R.; AKHTAR, S. Breast Cancer; evaluation of CA 15-3 serum levels. **The Professional Medical Journal**, Lahore, v. 13, n. 3, p. 338-340, 2006.

PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 89, n. 509, p. 10-29, 1994.

PEREZ, A. D.; RUTTEMAN, G. R.; PENA, L.; BEYNEN, A. C.; CUESTA, P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 12, n. 3, p. 132-139, 1998.

PERSSON, I. Estrogens in the causation of breast, endometrial and ovarian cancers – evidence and hypotheses from epidemiological findings. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 74, n. 5, p. 357-364, 2000.

PINOTTI, J. A.; TEIXEIRA, L. C. Câncer de mama: Importância, epidemiologia e fatores de risco. In: \_\_\_\_\_. **Tratado de ginecologia**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2000. v. 3, cap. 180, p. 2019-2222.

PORTELA, L. V. C. **Imunoquantificação da proteína S100 $\beta$  em líquido, soro e tecido cerebral por um ensaio de quimioluminescência**. 1999. 80 f. Dissertação (Mestrado

em Bioquímica) Instituto de Ciências Básicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamáriao caninos. In: CONGRESSO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 2002, Oeiras. **Proceedings...**Oeiras: SPCV; 2002. p. 183-190.

RIVERA, P. Utilidad clínica de los marcadores tumorales. **Revista Mexicana de Patologia Clinica**, Mexico, D.F ,v. 44, p. 245-258, 1997.

RODASKI, S.; PIEKARS, C. H. Biologia do Câncer. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009. cap. 2.

SAFI, F.; KOHLER, I.; RÖTTINGER, E.; SUHR, P., BEGER, H. G. Comparison of CA 15-3 and CEA in diagnosis and monitoring of breast cancer. **The International Journal of Biological Markers**, Milan, v. 4, n. 4, p. 207-214, 1989.

SARTIN, E. A.; BARNERS, S.; KWAPIEN, R. P.; WOLFE, L. G. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 53, n. 11, p. 2196-2200, 1992.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 43, n. 6, p. 1249-1261, 1969.

SCHWARTZ, M. Specialized techniques of cancer management and diagnosis. Cancer markers. In: DE VITA, V. T.; HELLMAN, S. J.; ROSENBERG, S. A. **Cancer: principles & practice of oncology**. Philadelphia: JB Lippincott, 1993. cap. 3, p. 531-542.

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

SILVEIRA, L. A. **Câncer ginecológico: diagnóstico e tratamento**. Florianópolis: UFSC, 2005.

SOREMNO, K. An update on canine mammary gland tumors. In: ACVIM Forum, 16, 1998, San Diego. **Proceedings...** Lakewood: American College of Veterinary Internal Medicine, 1998. p. 387-388.

SOUZA, J. V. Marcadores mucinosos associados ao câncer. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 46, n. 1-2, p. 70-83, 2002.

THOOLEN, R. J. VOS, J. H.; VAN DER LINDE-SIPMAN, J. S.; DE WEGER, R. A.; VANUNNIK, J. A.; MISDORP, W.; VAN DIJK, J. E. . Malignant fibrous histiocytomas in dogs and cats: immunohistochemical study. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 53, p. 198-204, 1992.

TONDINI, C; HAYES, D. F.; GELMAN, R; HENDERSON, I. C.; KUFEL, D. W. Comparison of CA 15-3 and carcinoembryonic antigen in monitoring the clinical course of patients with metastatic breast cancer. **Cancer Research**, Baltimore, v. 48, n. 14, p. 4107-4112, 1988.

TOUITOU, Y.; BOGDAN, A. Tumor marker in non malignant diseases. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, New York, v. 24, n. 7, p. 1083-1091, 1998.

WOJTACKI, J.; KRUSZEWSKI, W. J.; SLIWINSKA, M.; KRUSZEWSKA, E.; HAJDUKIEWICZ, W.; SLIWINSKI, W.; ROLKA-STEMPNIEWICZ, G.; GORALCZYK, M.; LESNIEWSKI-KMAK, K. Elevation of serum Ca 15-3 antigen: an early indicator of

distant metastasis from breast cancer. Retrospective analysis of 733 cases. **Przegląd Lekarski**, Warsaw, v.58, n. 6, p. 498-503, 2001.

WU, J. T.; NAKAMURA, R. M. **Human circulating tumor marker**: current concepts and clinical application. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1997. p. 183-188.

ZIDMAN I. The fate of circulating tumors cells. I. Passage of cells through capillaries. **Cancer Research**, Philadelphia, n 21, p. 38-39, 1961.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas – revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 32, p. 50-54, 2001.