

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DO RECEPTOR 2 DO
FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO HUMANO (HER2)
E DO ANTÍGENO NUCLEAR KI67 NO CARCINOMA DE
SACO ANAL CANINO**

Felipe Noleto de Paiva

Médico Veterinário

2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DO RECEPTOR 2 DO
FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO HUMANO (HER2)
E DO ANTÍGENO NUCLEAR KI67 NO CARCINOMA DE
SACO ANAL CANINO**

Discente: Felipe Noletto de Paiva

Orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi

Coorientador: Prof. Dr. Paulo César Jark

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.

2022

P149a

Paiva, Felipe Noleto de

Avaliação da imunoexpressão do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e do antígeno nuclear Ki67 no carcinoma de saco anal canino / Felipe Noleto de Paiva. -- Jaboticabal, 2022
60 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Andrigo Barboza De Nardi

Coorientador: Paulo César Jark

1. Medicina veterinária. 2. Imuno-histoquímica. 3. Câncer. 4. Cão. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

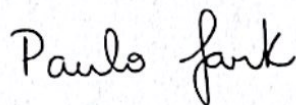
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DO RECEPTOR 2 DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO HUMANO (HER2) E DO ANTÍGENO NUCLEAR KI67 NO CARCINOMA DE SACO ANAL CANINO

AUTOR: FELIPE NOLETO DE PAIVA

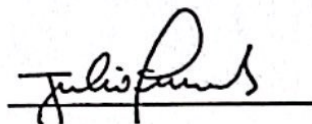
ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

COORDENADOR: PAULO CÉSAR JARK

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. PAULO CÉSAR JARK (Participação Virtual)
Universidade Brasil / Descalvado/SP



Prof. Dr. JULIO ISRAEL FERNANDES (Participação Virtual)
Dpto. de Clínica Médica Veterinária / Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária



Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 11 de julho de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Felipe Noleto de Paiva, nasceu no município de Goiânia, estado de Goiás, Brasil, no dia 19 de fevereiro de 1994. Ingressou no curso de medicina veterinária na Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG) no ano de 2012 e concluiu o curso no ano de 2017. Durante a graduação idealizou e fundou o grupo de estudos GEONCO/ONCOVET – UFG, foi coordenador discente do projeto de extensão Epidemiologia do Câncer em Caninos Domésticos no Hospital Veterinário da mesma instituição, e realizou estágios no serviço de oncologia do hospital veterinário da FCAV - Universidade Estadual Paulista (UNESP), campos de Jaboticabal, e da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Entre os anos de 2019 e 2021 realizou residência na área de Oncologia de Animais de Companhia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), atuando ainda como representante dos residentes junto ao Núcleo Gestor do programa de residência. Iniciou em março de 2021, como aluno regular no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FACV/UNESP), campos de Jaboticabal, nível de Mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi e coorientação do Prof. Dr. Paulo César Jark, onde se encontra no presente momento.

EPÍGRAFE

“Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”.

- Isaac Newton, 1675.

DEDICATÓRIA

Dedico mais essa conquista a minha avó Walda Cleres Marinho Noletto. A senhora foi exemplo de luta, determinação, resiliência e amor incondicional. Todas as minhas vitórias sempre serão suas.

AGRADECIMENTOS

Em meu terceiro texto de agradecimentos, em um período de 5 anos, me sinto feliz em afirmar que, em sua maioria, as mesmas pessoas continuam sendo nomeadas. E mesmo aqueles cujo caminho se distanciou do meu, saibam que eu guardo apenas as boas lembranças.

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida, à mãe Iemanjá e a todos os orixás, por guiarem e protegerem o meu caminho.

À minha mãe Gisele Marinho Noleto de Paiva, ao meu pai Carlson Queiroz Barbosa de Paiva e ao meu irmão Thiago Noleto de Paiva, por serem meu porto seguro em todos os momentos.

Aos meus avós José, Walda, Advo e Ceicinha, e a todos os meus familiares, tios e primos, por darem significado à palavra ‘família’.

Ao meu parceiro Gabriel, por seu apoio incondicional e por tornar minha caminhada mais leve.

A Capitu, por ser a minha companhia mais fiel, nos meus melhores e piores dias.

Aos amigos que permaneceram por perto, mesmo que sempre tão longe, Ricardo Vilela, André Coelho, Bruno Ferrari, Amanda Coelho, Thais Fontes Braga, Guilherme Elias, Lucas (Thor) Freitas, João Pedro Dantas, Antônio Fernandes, Susana Veiga.

Aos meus companheiros de SOV, Adilson Cabral, Gabriel (Chevette) Montanhim, Michele Rocha, Beatriz Paz, Noelia Talavera e Milena Magrin. Em especial ao Gabriel Carra, por dividir comigo as terças feiras, com muitos conselhos e café, e por toda a ajuda na elaboração desse trabalho; a Lais Menescal, que me acolheu desde o meu primeiro dia e será minha eterna ‘duplinha’; e a Stella Habib que tanto me ensinou em tão pouco tempo, e cuja amizade cresceu tão rápido que só pode ser explicada por conexões de outras vidas.

Aos meus orientadores Andriago Barboza de Nardi e Paulo César Jark, por terem aceitado meu convite para a orientação e por todos os ensinamentos. Vocês moldaram a minha trajetória profissional de uma forma que não consigo expressar em palavras, desde a minha primeira passagem pela UNESP, durante um estágio em 2014, até o presente momento. O profissional que me tornei, muito se deve a vocês. Espero um dia poder inspirar pessoas como vocês me inspiram.

Aos professores Mirela Tinucci Costa, Nazilton de Paula Reis Filho, Marília Gabriele Prado Albuquerque Ferreira e Annelise Carla Camplesi dos Santos, pelas contribuições dadas a esse trabalho, em diferentes momentos.

Ao professor Julio Israel Fernandes, por sempre me incentivar e me apoiar em todos os projetos e empreitadas, e pela amizade que construímos e mantivemos.

A toda a equipe de professores, residentes e funcionários do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel e da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

A todos os meus pacientes.

Muito obrigado.

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VI
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	01
1. Introdução	01
2. Revisão de literatura	02
3. Referências	22
CAPÍTULO 2 - ESTUDO RETROSPECTIVO DO CARCINOMA DE SACO ANAL CANINO NO BRASIL: 260 CASOS	34
1. Introdução	34
2. Material e métodos	36
3. Resultados	36
4. Discussão	39
5. Conclusões	40
6. Referências	41
CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO RECEPTOR 2 DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO HUMANO (HER2) E DO ANTÍGENO NUCLEAR KI67 NO CARCINOMA DE SACO ANAL CANINO	44
1. Introdução	45
2. Material e métodos	46
3. Resultados	50
4. Discussão	52
5. Conclusões	54
6. Referências	54
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	60

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

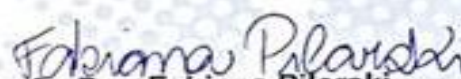
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação da Expressão do Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER2) nos Carcinomas de saco Anal Caninos"** protocolo nº 1678/21, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 19 de agosto de 2021.

Vigência do Projeto	01/08/2021 a 01/08/2022
Espécie / Linhagem	Canina
Nº de animais	Não especificado
Peso / Idade	Não especificado
Sexo	Não especificado
Origem	Amstras de blocos histopatológicos já coletadas, de exames previamente realizados por laboratório parceiro (VetPat – Campinas, SP)

Jaboticabal, 19 de agosto de 2021.


Prof. Dra. Fabiana Pilarski
 Coordenadora – CEUA

AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DO RECEPTOR 2 DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO HUMANO (HER2) E DO ANTÍGENO NUCLEAR KI67 NO CARCINOMA DE SACO ANAL CANINO

RESUMO – O carcinoma de saco anal é uma neoplasia marcada por comportamento agressivo, com diversas formas de terapia relatadas. A cirurgia permanece como tratamento de eleição, sendo, no entanto, controversa em casos avançados e com metástase instalada. Os fatores prognósticos conhecidos, são igualmente controversos, e dessa forma, novos estudos têm sido realizados buscando novos marcadores prognósticos e preditivos. O HER2 é uma proteína de membrana relacionada ao processo de tumorigênese, comprovadamente expressa em diferentes tipos tumorais, na medicina humana e veterinária. O Ki67, por sua vez, é uma proteína nuclear, com função relacionada à proliferação celular que atua, como importante marcador prognóstico no câncer. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a imunoexpressão dos marcadores HER2 e Ki67 em casos de carcinoma de saco anal canino. Inicialmente foi realizado um estudo retrospectivo, acerca do carcinoma de saco anal em caninos, com um N de 260 casos. Posteriormente, foram obtidas amostras de carcinoma de saco anal, incluídas em parafina, junto ao laboratório parceiro, divididas em quatro grupos: maior diâmetro tumoral menor que 2,5cm, maior diâmetro tumoral maior que 2,5cm, linfonodos metastáticos e grupo controle. Cada grupo foi representado por um N de 10 amostras, sendo então realizada imunomarcagem para os marcadores HER2 e Ki67. Foi encontrado um maior acometimento em animais adultos a idosos, do sexo feminino e sem raça definida. Em relação ao tamanho tumoral, observou-se que os tumores frequentemente são diagnosticados já com dimensões elevadas. Quanto a avaliação imunoistoquímica, a marcação de HER2 foi positiva em 45% dos casos de tumor primário, com marcação 100% negativa no grupo controle, composto por amostras de saco anal íntegro. A imunoexpressão do Ki67 teve mediana de 25% em todos os grupos avaliados, com exceção do grupo controle, com mediana de 8% de imunoexpressão. Não houve associação entre a imunoexpressão do HER2 ou do Ki67 nos diferentes tamanhos tumorais, nem na comparação de tumores primários e metastáticos. O estudo demonstrou que a imunoexpressão do HER2 e do Ki67 está presente em carcinomas de saco anal, representando um potencial alvo terapêutico, diferindo dos sacos anais não neoplásicos.

Palavras-chave: adenocarcinoma apócrino do saco anal, imunoistoquímica, neoplasia.

IMMUNOEXPRESSION EVALUATION OF HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 2 (HER2) AND NUCLEAR ANTIGEN KI67 IN CANINE ANAL SAC CARCINOMA

ABSTRACT – Anal sac carcinoma is a neoplasm marked by aggressive behavior, with several forms of therapy reported. Surgery remains the treatment of choice, although it is controversial in advanced cases with established metastasis. The known prognostic factors are equally controversial, and thus, new studies have been carried out looking for new prognostic and predictive markers. HER2 is a membrane protein related to the tumorigenesis process, proven to be expressed in different tumor types in Human and Veterinary Medicine. Ki67 is a nuclear protein, with function related to cell proliferation that acts as an important prognostic marker in cancer. The aim of the present study was to evaluate the immunoexpression of HER2 and Ki67 markers in cases of canine anal sac carcinoma. Initially, a retrospective study was carried out on anal sac carcinoma in canines, with an N of 260 cases. Subsequently, samples of anal sac carcinoma, embedded in paraffin, were obtained from the partner laboratory, divided into four groups: largest tumor diameter less than 2.5 cm, largest tumor diameter greater than 2.5 cm, metastatic lymph nodes and control group. Each group was represented by an N of 10 samples, and immunostaining for markers HER2 and Ki67 was then performed. A greater involvement was found in adult to elderly animals, female and mixed breed. Regarding the tumor size, it was observed that tumors are often diagnosed with high dimensions. As for the immunohistochemical evaluation, HER2 staining was positive in 45% of the primary tumor cases, with 100% negative staining in the control group, composed of intact anal sac samples. Ki67 immunoexpression had a median of 25% in all groups evaluated, with the exception of the control group, with a median of 8% immunoexpression. There was no association between HER2 or Ki67 immunoexpression in different tumor sizes, nor in the comparison of primary and metastatic tumors. The study demonstrated that HER2 and Ki67 immunoexpression is present in anal sac carcinomas, representing a potential therapeutic target, differing from non-neoplastic anal sacs.

Key words: apocrine adenocarcinoma of the anal sac, immunohistochemistry, neoplasm.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 01

Figura 1: Representação esquemática da estrutura dos receptores HER, evidenciando os segmentos extracelular, transmembranar e intracelular. Adaptado de Yarden (2001) 03

Figura 2: Representação esquemática do processo de ligação e dos respectivos ligantes associados aos receptores da família HER. Adaptado de Yarden (2001) ... 04

Figura 3: Representação esquemática do processo de ativação do HER2 e do mecanismo de ação das drogas Lapatinib, Trastuzumab e Pertuzumab durante o processo de ativação do receptor. Adaptado de Loibl e Gianni (2016) 07

Figura 4: Representação esquemática da variação da expressão do Ki67 ao longo do ciclo celular. A: Representação de uma célula com curto ou ausente período de quiescência. B: Representação de uma célula com prolongado período de quiescência. Adaptado de Gil e Vagnarelli (2018) 10

Figura 5: Representação esquemática da região perianal canina, evidenciando a localização dos sacos anais e estrutura muscular associada. Adaptado de Hill's Atlas of Veterinary Clinical Anatomy (2004) 12

Figura 6. Representação esquemática da drenagem linfática em canino, com destaque para o linfocentro ileossacral. 1: Linfonodos ilíacos mediais, 2: Linfonodos ilíacos internos, 3: Linfonodos sacrais. AO: aorta, CVC: veia cava caudal, DCI: vasos ilíacos circunflexos profundos, EI: vasos ilíacos externos, LK: rim esquerdo, RK: rim direito. Adaptado de Penninck e D'anjou, 2015 13

Figura 7: A/B: Pacientes caninos manifestando carcinoma de saco anal em manifestação típica. Diagnóstico confirmado mediante exame de histopatologia. Fonte: arquivo pessoal 15

CAPÍTULO 3 44

Figura 1: Fotomicrografias de carcinoma de saco anal em exame histopatológico. Hematoxilina e eosina (HE). A: Aumento de 10x. B: Aumento de 40x..... 47

Figura 2: Fotomicrografias de imunomarcagem do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). A: controle positivo representando escore 3+. Aumento de 10x. B: imunomarcagem em carcinoma de saco anal representando escore 2+. Aumento de 40x. C: imunomarcagem em carcinoma de saco anal representando escore 2+. Aumento de 40x..... 49

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 01

Tabela 1: Modelo para estadiamento do carcinoma de saco anal proposto por Polton e Brearley (2007) 18

CAPÍTULO 2 34

Tabela 1: Perfil etário de acometimento relatado de acordo com as faixas etárias estabelecidas. Descrição em valores absoluto e percentual 37

Tabela 2: Perfil racial de acometimento entre caninos. Descrição em valores absoluto e percentual 38

CAPÍTULO 3 44

Tabela 1: modelo de classificação da imunoexpressão do HER2 em escores proposto pela ASCO/CAP 49

Tabela 2: Imunoexpressão do HER2 descrita em escores de acordo com os grupos estabelecidos 50

Tabela 3: Imunoexpressão de Ki67 descrita em valores percentuais de acordo com os grupos estabelecidos 51

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

Os tumores de saco anal, principalmente na variante maligna, são comuns na medicina veterinária, e estão relacionados à um potencial agressivo, com importantes taxas de infiltração local e principalmente metástase à distância. O prognóstico varia de reservado a desfavorável devido ao diagnóstico frequentemente tardio e a baixa eficácia das modalidades terapêuticas atualmente disponíveis (Barnes e Demetriou, 2017; Chambers et al., 2020; Withrow et al., 2020).

O receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico também denominado HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor - Type 2) representa uma proteína relacionada ao desenvolvimento neoplásico, sendo a sua expressão bem estabelecida na medicina humana em diversos tipos tumorais (Hynes e Stern, 1994; Gutierrez e Schiff, 2011; Hsu e Hung, 2016). Na medicina veterinária pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de avaliar a expressão do HER2 em tumores que já possuem a sua expressão observada na medicina humana, como no caso dos carcinomas mamários, de tireoide, de células transicionais vesicais, gástricos e pulmonares (Tsuboi et al., 2019; Lorch et al., 2019; Yoshimoto et al., 2019b; Yoshimoto et al., 2020; Brunetti et al., 2021).

O antígeno nuclear Ki67, por sua vez, é uma proteína nuclear expressa em células em divisão celular e ausente em células em repouso. Sua forma de expressão, somada a meia-vida curta, tornam a proteína um importante marcador prognóstico, reconhecido na medicina humana e veterinária (Meuten, 2017; Gil e Vagnarelli, 2018; Miller et al., 2018).

O presente trabalho, tem o propósito de aprofundar a investigação acerca dos marcadores HER2 e Ki67 nos carcinomas de saco anal canino. Ao avaliar a expressão desses marcadores, objetiva-se definir, potencialmente novas ferramentas prognósticas, preditivas e terapêuticas, permitindo diferenciar as neoplasias de comportamento mais agressivo, daquelas menos agressivas, antecipando o comportamento tumoral, e fornecendo um alvo molecular para novas terapias medicamentosas em desenvolvimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico (HER2)

2.1.1. Biologia dos receptores HER

O HER2 é uma proteína de membrana pertencente à família do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR/HER). Sua expressão ocorre de forma natural nos tecidos orgânicos, com exceção dos tecidos hematopoiéticos, com função relacionada ao crescimento e diferenciação celular, e importância desde a vida fetal até o completo desenvolvimento do organismo após o nascimento (Hynes e Stern, 1994; Yarden, 2001; Freitas, 2007; Moasser, 2007; Gutierrez e Schiff, 2011; Krishnamurti e Silverman, 2014; Yan et al., 2015; Hsu e Hung, 2016).

A família dos receptores HER é formada por quatro receptores de membrana, em formas homólogas, denominados receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR ou HER1), receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico (HER2), receptor tipo 3 do fator de crescimento epidérmico (HER3) e receptor tipo 4 do fator de crescimento epidérmico (HER4) (Yarden, 2001; Krishnamurti e Silverman, 2014; Hsu e Hung, 2016).

Estruturalmente, os quatro receptores são semelhantes, sendo compostos por um segmento extracelular ligante, um segmento transmembranar e um segmento intracelular de tirosina-quinase (Figura 1) (Yarden, 2001; Moasser, 2007; Krishnamurti e Silverman, 2014; Hsu e Hung, 2016). Sabe-se que a evolução dos receptores HER acompanhou a evolução dos organismos animais, evidenciado pela observação de formas ancestrais desses receptores em animais invertebrados e pela presença dos quatro receptores, em formas mais complexas, nos mamíferos (Yarden, 2001).

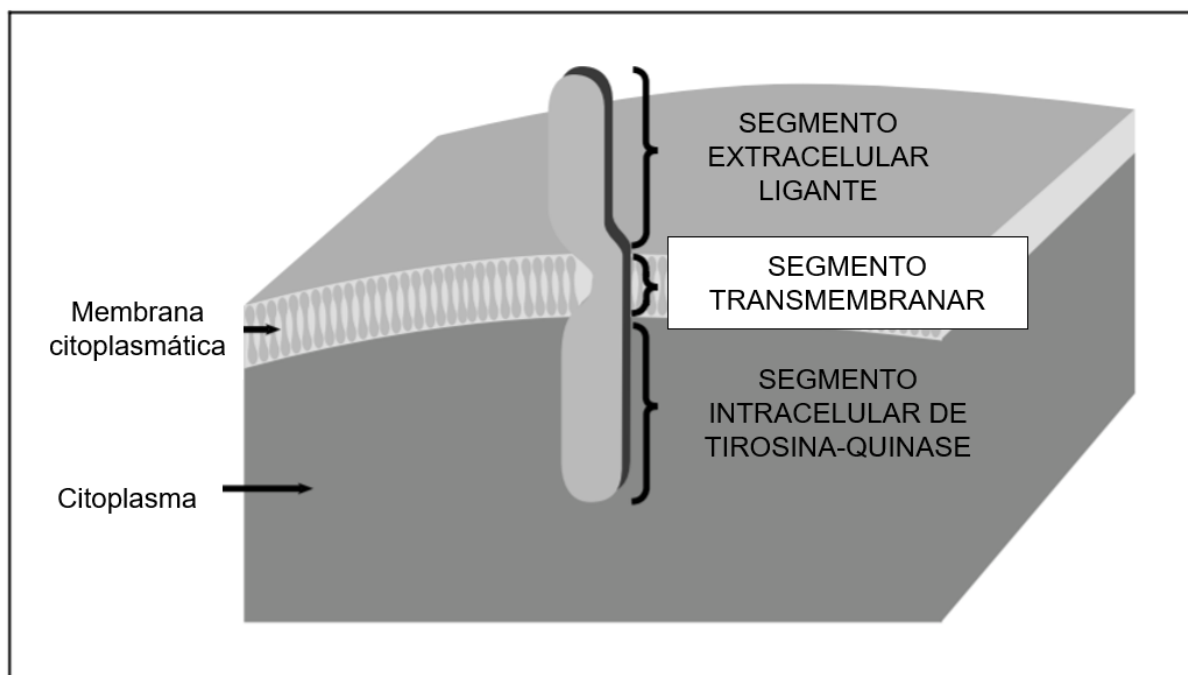


Figura 1. Representação esquemática da estrutura dos receptores HER, evidenciando os segmentos extracelular, transmembranar e intracelular. Adaptado de Yarden (2001).

A ativação dos HERs ocorre por meio da ligação de um ligante específico ao domínio extracelular do receptor, que ativa o processo de dimerização e transfosforilação no domínio intracelular da tirosina quinase, liberando estímulos ao núcleo para a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Moasser, 2007; Gutierrez e Schiff, 2011; Krishnamurti e Silverman, 2014; Hsu e Hung, 2016).

O processo é controlado pelos quatro receptores, e por seus respectivos ligantes (Figura 2). Dentre eles, são reconhecidos ligantes do HER1 o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento transformador alfa (TGF- α), as anfiregulinas (AR), o fator de crescimento semelhante ao EGF de ligação à heparina (HB-EGF), as betacelulinas (β -cel) e as epiregulinas; e dos receptores HER3 e HER4 as neuregulinas e suas isoformas (NDF). Não há ligantes conhecidos para o HER2 (Yarden, 2001; Moasser, 2007; Gutierrez e Schiff, 2011; Krishnamurti e Silverman, 2014; Hsu e Hung, 2016).

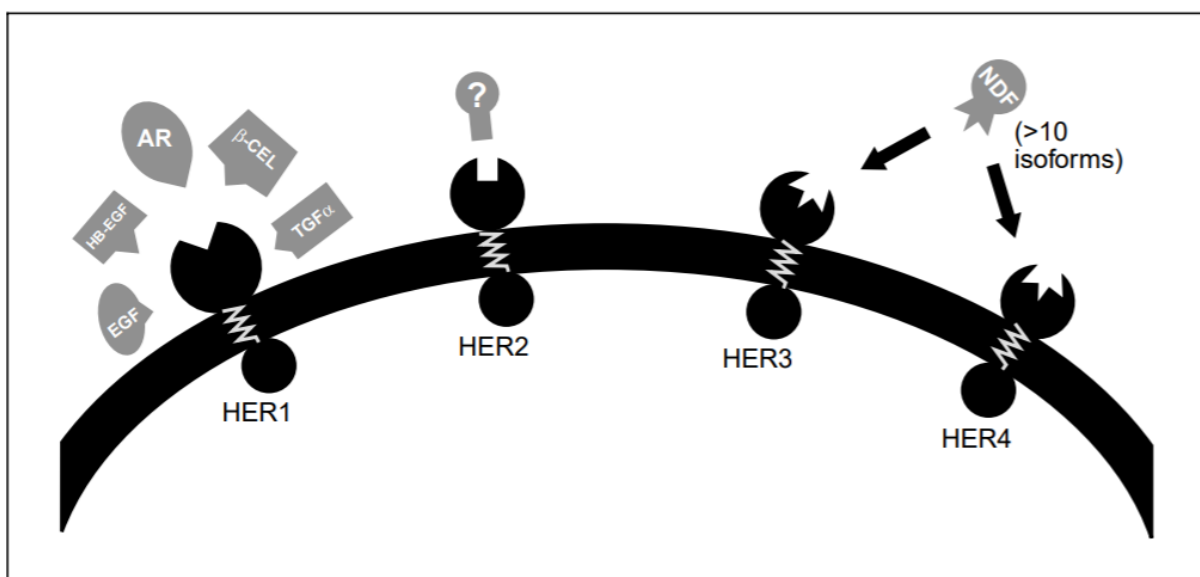


Figura 2. Representação esquemática do processo de ligação e dos respectivos ligantes associados aos receptores da família HER. Adaptado de Yarden (2001).

No entanto, essa via de sinalização não é considerada uma via singular, mas sim uma complexa rede de sinalização. Após a ligação, os receptores monômeros, passam por um processo chamado de dimerização, que leva a associação entre dois monômeros e resulta na formação de homodímeros (exemplo: HER1-HER1) ou heterodímeros (exemplo: HER1-HER2) (Yarden, 2001; Moasser, 2007; Hsu e Hung, 2016). Os diferentes dímeros formados são responsáveis por diferentes estímulos celulares, e dessa forma, um mesmo ligante pode formar diferentes dímeros que resultam em diferentes respostas celulares (Yarden, 2001; Hsu e Hung, 2016; Majumder et al., 2021).

Em relação ao HER2, devido à ausência de ligantes conhecidos, acredita-se que a ativação ocorra apenas pela formação de dímeros com os demais receptores. Devido a necessidade de dimerização para a sua ativação, o HER2 possui uma maior capacidade de ligação aos demais receptores, que o torna o correceptor preferencial para a formação de monômeros (Yarden, 2001; Gutierrez e Schiff, 2011; Hsu e Hung, 2016; Majumder et al., 2021).

Os heterodímeros formados com o HER2 possuem ligação mais duradoura, que geram sinalização mais potente, sendo a ligação HER2-HER3 a de maior

intensidade entre todas elas (Yarden, 2001; Moasser, 2007; Gutierrez e Schiff, 2011; Yan et al., 2015; Hsu e Hung, 2016; Majumder et al., 2021). A sinalização exacerbada pelos heterodímeros relacionados ao HER2 leva ao aumento da mitogenicidade que pode ser responsável por estimular o crescimento neoplásico (Yarden, 2001; Moasser, 2007; Hsu e Hung, 2016; Majumder et al., 2021).

2.1.2. Ação neoplásica do HER2

O exato mecanismo pelo qual os receptores HER2 atuam na transformação neoplásica não é amplamente conhecido, porém sabe-se que o seu aumento é frequente em diversos tipos neoplásicos (Hynes e Stern, 1994; Yarden, 2001). A superexpressão da proteína HER2 foi inicialmente observada na medicina humana em neoplasias mamárias e posteriormente ovarianas (Yarden, 2001; Krishnamurti e Silverman, 2014; Majumder et al., 2021), sendo atualmente relatada em uma variedade de tumores, principalmente de origem epitelial (Yan et al., 2015). Quando superexpresso, o seu aumento é significativo, podendo se apresentar até 100x vezes superior frente às células normais (Hynes e Stern, 1994).

O aumento da expressão do HER2 está relacionado a uma amplificação gênica do oncogene denominado HER2/neu ou c-erbB-2 localizado no cromossomo 17 (17q12), responsável pela codificação desse receptor (Hynes e Stern, 1994; Moasser, 2007; Gutierrez e Schiff, 2011; Krishnamurti e Silverman, 2014; Hsu e Hung, 2016; Withrow et al., 2020). Acredita-se que a superexpressão dos receptores HER2 leva a um aumento da formação dos seus dímeros, que ativa uma cascata de sinalização, criando acentuados estímulos proliferativos e uma desregulação nos mecanismos de controle celular, promovendo a tumorigênese (Hynes e Stern, 1994; Moasser, 2007; Gutierrez e Schiff, 2011; Yan et al., 2015).

Diversos métodos são descritos para a avaliação da expressão do HER2. A identificação da superexpressão pode ser feita pelos testes de imunoistoquímica, ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay) e Western blot; enquanto a avaliação da amplificação pode ser feita pelos testes de *fluorescence in situ hybridization* (FISH), *chromogenic in situ hybridization* (CISH), *silver in situ*

hybridization (SISH), Southern blot e reação em cadeia da polimerase (PCR) (Krishnamurti e Silverman, 2014; Perez et al., 2014). No entanto, a imunoistoquímica permanece como modalidade mais amplamente e rotineiramente empregada por se tratar de uma técnica mais acessível (Gutierrez e Schiff, 2011; Krishnamurti e Silverman, 2014; Perez et al., 2014).

O receptor HER2 é reconhecido como um importante marcador prognóstico, principalmente nas neoplasias mamárias (Yarden, 2001; Gutierrez e Schiff, 2011; Krishnamurti e Silverman, 2014). O aumento da proteína é associado a um comportamento tumoral mais agressivo, e relacionado à piores prognósticos, tanto na medicina humana quanto veterinária (Yarden, 2001; Hsu e Hung, 2016; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020).

Como alvo terapêutico, já foi estabelecido que o bloqueio do receptor HER2 enfraquece a sinalização do crescimento celular e reduz o crescimento maligno (Yarden, 2001), com diversas drogas desenvolvidas com esse objetivo (Gutierrez e Schiff, 2011). Atualmente, utilizam-se principalmente anticorpos monoclonais anti-HER2 que atuam reconhecendo e bloqueando o domínio extracelular do receptor (Yarden, 2001; Scaltriti et al., 2009; Gutierrez e Schiff, 2011; Loibl e Gianni, 2016; Meuten, 2017).

Dentre os medicamentos inibidores, diferenciam-se aqueles considerados reversíveis ou de primeira geração e aqueles considerados irreversíveis ou de segunda geração (García et al., 2020). Dentre os inibidores de primeira geração, o Lapatinib que atua como um inibidor da tirosina quinase do HER2 (Scaltriti et al., 2009), tem sido alvo de diversos estudos acerca da segurança e dose ideal na medicina veterinária (Tanaka et al., 2020) e do seu uso em outros tipos tumorais em cães (Sakai et al., 2018), demonstrando respostas promissoras, como no caso dos carcinomas uroteliais (Maeda et al., 2022). Outras drogas como o trastuzumab, pertuzumab também se encontram em fases avançadas de estudos, possuindo diferentes mecanismos de ação que interferem na sinalização do HER2 (Loibl e Gianni, 2016) (Figura 3).

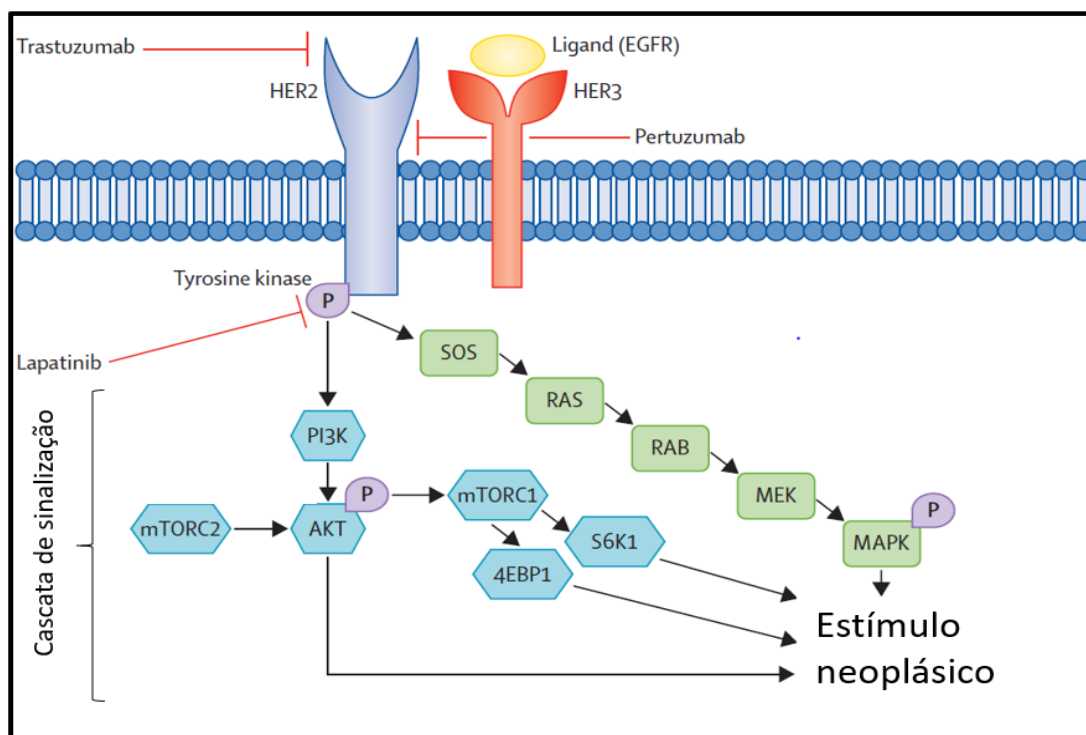


Figura 3. Representação esquemática do processo de ativação do HER2 e do mecanismo de ação das drogas Lapatinib, Trastuzumab e Pertuzumab durante o processo de ativação do receptor. Adaptado de Loibl e Gianni (2016).

Uma segunda classe de medicamentos, que potencialmente podem beneficiar aqueles pacientes com neoplasias que apresentam a expressão do HER2, corresponde à vacina policlonal anti-EGFR/HER2 e à vacina recombinante de listeria que atuam estimulando uma resposta imunológica ao antígeno tumoral (Mason et al., 2016; Doyle et al., 2021; Musser et al., 2021).

2.1.3. HER2 na medicina veterinária

A avaliação da superexpressão do HER2 também é alvo de estudos em processos neoplásicos em cães e gatos. Nos tumores mamários dessas espécies se observam resultados variáveis com as taxas de superexpressão em neoplasias mamárias malignas relatadas entre 16.7% e 29.7% (De Las Mulas et al., 2003; Millanta et al., 2005; Hsu et al., 2009; Ressel et al., 2013; Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017) em comparação com as taxas de 25 a 30% observadas nos tumores mamários humanos (Meuten, 2017). Quando avaliados os tumores benignos, as taxas também

foram variáveis (Hsu et al., 2009; Ressel et al., 2013). Dessa forma, sugere-se que o HER2 e o oncogene c-erbB-2 também possuam função ativa na proliferação do tecido mamário das cadelas (De Las Mulas et al., 2003; Ressel et al., 2013) e gatas (Millanta et al., 2005).

Outras neoplasias têm sido alvo de estudos semelhantes quanto a expressão do receptor, com as pesquisas geralmente direcionadas aos carcinomas, que já possuem uma base de conhecimento estabelecido na medicina humana quanto a expressão do HER2, como os carcinomas de tireoide, carcinoma vesicais, carcinomas gástricos e carcinomas pulmonares (Terragni et al., 2014; Tsuboi et al., 2019; Lorch et al., 2019; Yoshimoto et al., 2019b; Yoshimoto et al., 2020; Brunetti et al., 2021). Os osteossarcomas também foram foco de estudos, na tentativa de buscar novos alvos terapêuticos, devido a elevada agressividade da doença (Flint et al., 2004).

A expressão do HER2 nos carcinomas de saco anal foi previamente avaliada por Yoshimoto *et al.* (2019a) que observaram uma maior expressão do receptor no tecido neoplásico frente ao tecido normal, sugerindo mais estudos na tentativa de validar o receptor como um marcador prognóstico.

2.2. Antígeno nuclear Ki67

2.2.1. Biologia do antígeno nuclear Ki67

A proteína denominada Ki67 é reconhecida como um antígeno, ou proteína nuclear, comumente associada a proliferação celular, devido a sua elevada expressão em células ativas no ciclo celular, e mínima expressão em células em quiescência (Endl e Gerdes, 2000; Scholzen e Gerdes, 2000; Brown e Gatter, 2002; Tao Li et al., 2015; Gil e Vagnarelli, 2018; Miller et al., 2018).

Sua descoberta se deu em células de linfoma Hodgkin em camundongos (Gerdes et al., 1983), sendo atualmente descrita na maioria dos mamíferos (Scholzen e Gerdes, 2000; Sun e Kaufman, 2018). Sua denominação se deu em homenagem a cidade de realização da pesquisa inicial, Kiel, e ao número do clone original de identificação do antígeno, clone 67 (Gerdes et al., 1983).

Estruturalmente trata-se de uma proteína de grandes dimensões, com peso molecular de aproximadamente 395 kDa (Endl e Gerdes, 2000; Scholzen e Gerdes, 2000; Brown e Gatter, 2002; Tao Li et al., 2015; Menona et al., 2019). Sua composição é complexa, e formada por uma série de domínios e sítios de ligação, apresentando similaridades a outras proteínas também envolvidas na regulação do ciclo celular (Endl e Gerdes, 2000; Scholzen e Gerdes, 2000; Brown e Gatter, 2002; Tao Li et al., 2015; Miller et al., 2018; Sun e Kaufman, 2018; Menona et al., 2019).

Funcionalmente, sabe-se que a proteína Ki67 apresenta sobrevida curta, de aproximadamente 1 hora a 1,5 horas, regulada por um equilibrado mecanismo de síntese e degradação proteica (Endl e Gerdes, 2000; Brown e Gatter, 2002; Tao Li et al., 2015; Meuten, 2017; Gil e Vagnarelli, 2018; Sun e Kaufman, 2018), estando presente em todas as células em proliferação, normais ou neoplásicas (Scholzen e Gerdes, 2000).

Pouco se sabe, no entanto, sobre a sua exata função no organismo, com estudos que sugerem o seu papel em diferentes fases do processo de divisão celular sendo considerada vital ao processo de proliferação celular (Endl e Gerdes, 2000; Scholzen e Gerdes, 2000; Brown e Gatter, 2002; Booth e Earnshaw, 2017; Sobecki et al., 2017; Gil e Vagnarelli, 2018; Miller et al., 2018; Sun e Kaufman, 2018; Menona et al., 2019).

A expressão de Ki67 é observada durante todo o ciclo celular, nas fases G1, S, G2 e M, ausente apenas na fase G0 nas células em repouso (Scholzen e Gerdes, 2000; Tao Li et al., 2015; Meuten, 2017; Yang et al., 2017; Menona et al., 2019). No entanto, estudos recentes têm demonstrado variações na sua localização e expressão ao longo do processo. Acredita-se que durante a fase de interfase o Ki67 se localize no núcleo celular, se acumulando posteriormente no nucléolo durante a fase G2, e na periferia dos cromossomos mitóticos durante a mitose, permanecendo ali até a reforma do núcleo em G1 após a segregação cromossômica (Gil e Vagnarelli, 2018).

De modo semelhante, os níveis de expressão também sofrem variações ao longo do ciclo celular, sendo inicialmente baixos durante as fases G1 e S, medianos durante G2, atingindo o pico no início e uma diminuição significativa ao final da fase M (Tao Li et al., 2015; Yang et al., 2017). Durante as fases S, G2 e M a célula tem um

acúmulo da proteína, mediante estímulos positivos, e durante as fases G1 e G0 ocorre a degradação proteica (Sobecki et al., 2017; Yang et al., 2017; Miller et al., 2018). Dessa forma, os níveis de expressão observados durante as fases G0 e G1 podem sugerir quanto tempo a célula passou em quiescência e há quanto tempo ela retornou ao ciclo celular (Figura 4) (Sobecki et al., 2017; Gil e Vagnarelli, 2018; Miller et al., 2018; Sun e Kaufman, 2018).

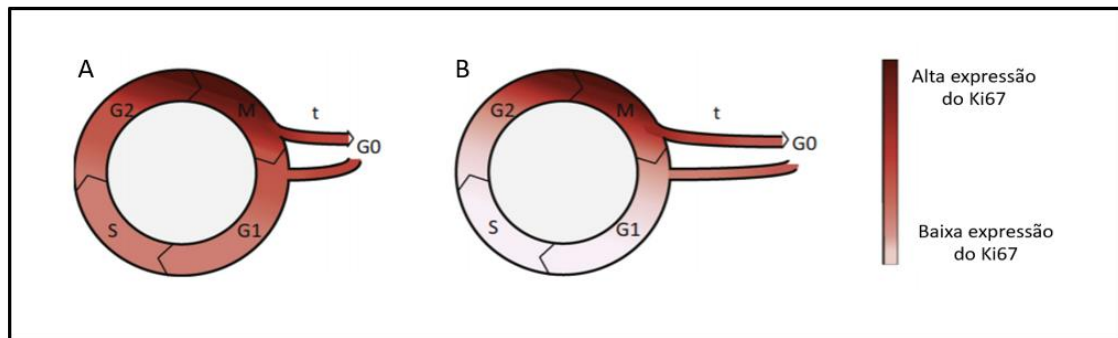


Figura 4. Representação esquemática da variação da expressão do Ki67 ao longo do ciclo celular. A: Representação de uma célula com curto ou ausente período de quiescência. B: Representação de uma célula com prolongado período de quiescência. Adaptado de Gil e Vagnarelli (2018).

2.2.2. Ki67 na medicina veterinária

Devido aos diversos achados que associam a proteína Ki67 ao ciclo celular, e ao seu curto período de meia-vida, a proteína foi estabelecida como um dos principais marcadores celulares relacionados a proliferação celular, amplamente utilizada e estudada na oncologia humana e veterinária (Scholzen e Gerdes, 2000; Meuten, 2017; Gil e Vagnarelli, 2018).

Para a avaliação da sua expressão utiliza-se principalmente o exame de imunohistoquímica, que avalia a proteína qualitativamente, quanto a expressão ou não, e quantitativamente relacionado ao nível de expressão (Gil e Vagnarelli, 2018; Miller et al., 2018; Menona et al., 2019).

Sua aplicação como marcador prognóstico de índice proliferativo é descrita em diferentes tipos tumorais, com sistemas de graduação e valores de corte descritos para as diferentes neoplasias (Scholzen e Gerdes, 2000; Tao Li et al., 2015; Yang et al., 2017; Gil e Vagnarelli, 2018; Miller et al., 2018; Sun e Kaufman, 2018). A proteína

também já foi associada como um marcador de malignidade, agressividade tumoral e à presença de metástases (Tao Li et al., 2015; Menona et al., 2019). Atualmente avalia-se ainda o seu potencial terapêutico, com terapias alvo direcionadas a inibição da proteína em fases iniciais de desenvolvimento (Yang et al., 2017; Menona et al., 2019).

Na medicina veterinária, o Ki67 é fortemente associado ao índice de proliferação celular, sendo um marcador prognóstico amplamente estudado em diferentes neoplasias como os melanomas cutâneo e oral, mastocitoma, tumores mamários, carcinomas cutâneos, tumor venéreo transmissível, linfoma, insulinoma, plasmocitoma cutâneo, tumores hepáticos, tumores testiculares e tumores perianais (Buishand et al., 2010; Bergin et al., 2011; Berlato et al., 2015; Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020). Sua avaliação, de modo semelhante a medicina humana, é feita por meio de exame de imunoistoquímica, com mensuração em valores percentuais, e associada a valores de corte pré-estabelecidos que permitem uma interpretação mais precisa (Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020).

2.3. Anatomia e fisiologia dos sacos anais

A região perianal canina é permeada por glândulas que possuem diferentes funções no organismo, incluindo as glândulas perianais ou glândulas hepatoides e os sacos anais (Withrow et al., 2020).

Os sacos anais estão presentes em todos os carnívoros (Duijkeren, 1995; Jung et al., 2016), e consistem em divertículos cutâneos, que se localizam entre os músculos interno e externo do esfíncter anal, dispostos em pares e emparelhados. Cada saco anal é continuado por um ducto excretor que se abre para a superfície cutânea. Nos cães e gatos, sua localização está na superfície ventro-lateral direita e ventro-lateral esquerda do ânus, nas posições de quatro horas e oito horas (Figura 5) (Ragni, 2012; Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020).

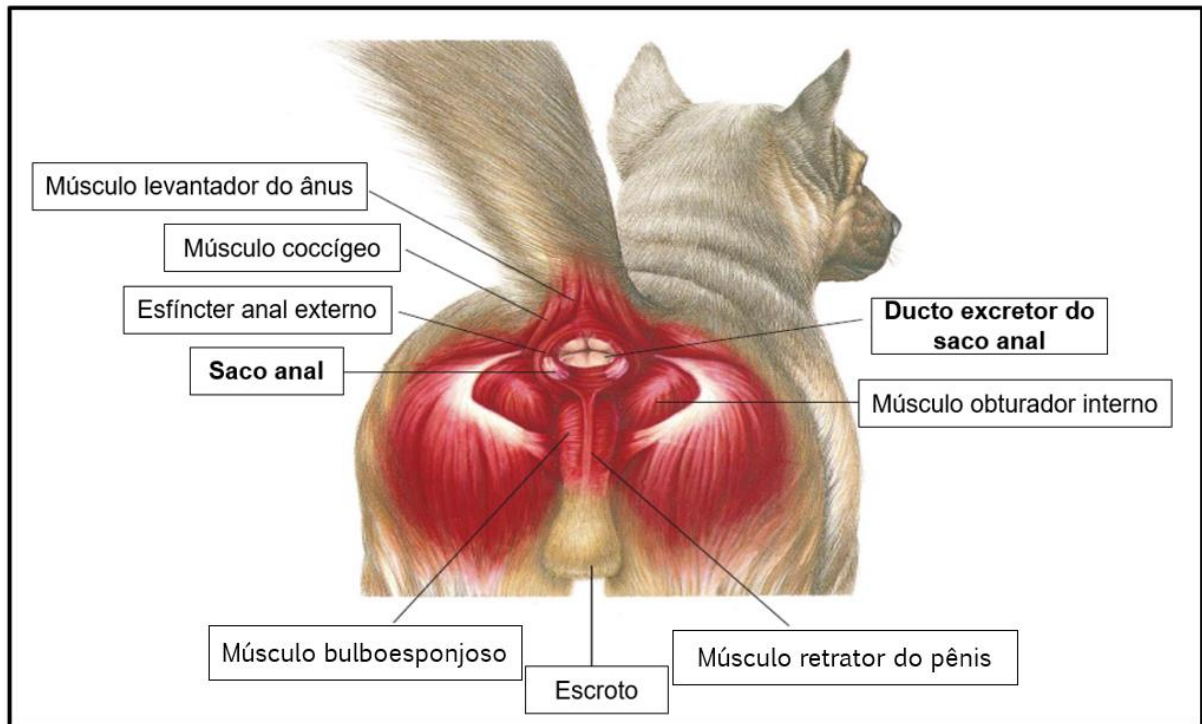


Figura 5. Representação esquemática da região perianal canina, evidenciando a localização dos sacos anais e estrutura muscular associada. Adaptado de Hill's Atlas of Veterinary Clinical Anatomy (2004).

No interior dos divertículos estão presentes glândulas conhecidas como glândulas apócrinas do saco anal, que dão origem a neoplasia de mesmo nome (Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020). Nos caninos as glândulas estão presentes em grande número e se concentram principalmente na região do fundo dos sacos anais, enquanto a superfície ductal é permeada por glândulas sebáceas. Ambos, sacos anais e ductos excretores, são revestidos por epitélio escamoso estratificado (Duijkeren, 1995; Ragni, 2012; Jung et al., 2016).

Quanto à drenagem e vascularização, o suporte sanguíneo da região é realizado pelas artérias retais caudais e artérias perineais caudais (Ragni, 2012). A drenagem linfática é realizada por múltiplas vias, ocorrendo principalmente para a cadeia linfática sublombar ou linfocentro ileossacral, composto pelos linfonodos ilíaco médio, ilíaco interno e sacrais (figura 6) (Penninck e D'anjou, 2015; Linden et al., 2019).

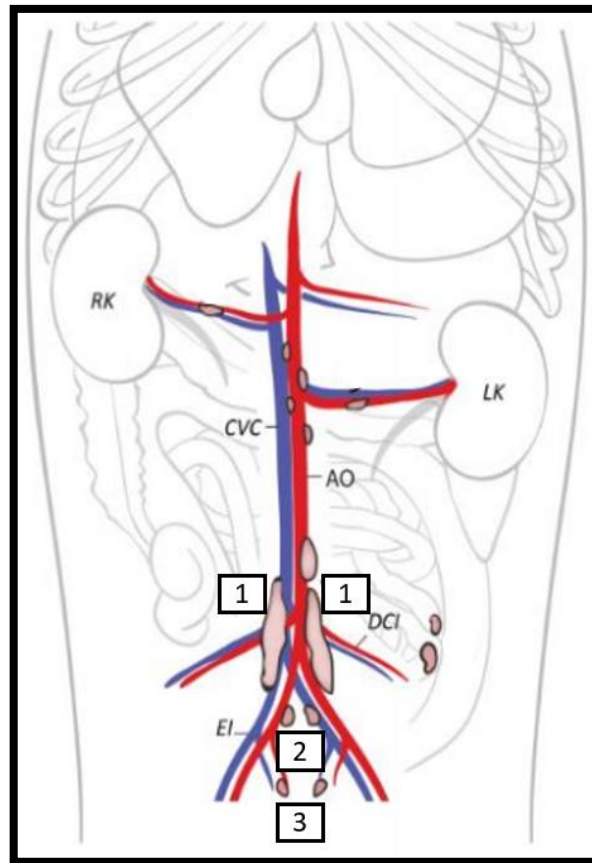


Figura 6. Representação esquemática da drenagem linfática em caninos, com destaque para o linfocentro ileossacral. 1: Linfonodos ilíacos mediais, 2: Linfonodos ilíacos internos, 3: Linfonodos sacrais. AO: aorta, CVC: veia cava caudal, DCI: vasos ilíacos circunflexos profundos, EI: vasos ilíacos externos, LK: rim esquerdo, RK: rim direito. Adaptado de Penninck e D'anjou, 2015.

A função dos sacos anais está relacionada a comportamentos sociais, sexuais e territoriais, por meio da liberação do seu conteúdo, que é controlada pelo esfíncter anal externo. O conteúdo fluido e fétido do saco anal é composto pela secreção das glândulas apócrinas e das glândulas sebáceas do ducto, além do produto do epitélio descamado e das bactérias ali presentes. (Duijkeren, 1995; Polton et al., 2006; Ragni, 2012; Jung et al., 2016; Bergeron et al., 2020).

As afecções dos sacos anais podem ser divididas em dois grupos: condições não neoplásicas, que inclui traumas, abscessos e a saculite; e as condições neoplásicas representadas pelos adenomas e carcinomas (Ragni, 2012; Jung et al., 2016).

2.4. Carcinoma de saco anal

2.4.1. Etiologia e epidemiologia

As neoplasias de saco anal têm origem nas glândulas apócrinas localizadas no interior dos sacos anais, e dessa forma podem ser chamadas adenomas de saco anal ou da glândula apócrina do saco anal, para a variante benigna; e adenocarcinoma/carcinoma de saco anal ou da glândula apócrina do saco anal, para a variante maligna (Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020). Para fins de padronização, empregou-se no texto a terminologia ‘carcinoma de saco anal’.

Sua etiologia não é completamente elucidada (Withrow et al., 2020), porém sugere-se a influência de inflamações crônicas e processos bacterianos como fatores predisponentes (Polton et al., 2006; Bergeron et al., 2020). A dependência hormonal não está presente como em outras neoplasias perianais (Daleck e Nardi, 2016; Brodzki et al., 2021).

O carcinoma de saco anal figura entre as neoplasias mais frequentes da região perianal nos caninos, correspondendo a 17% dos tumores nessa localização, e 2% de todas as neoplasias cutâneas. Os carcinomas de saco anal são raros na espécie felina, e os adenomas são infrequentes em ambas as espécies (Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020).

O perfil de acometimento envolve principalmente animais adultos e idosos (Williams et al., 2003; Polton e Brearley 2007; Polton et al., 2007; Knudsen et al., 2013; Daleck e Nardi, 2016; Palladino et al., 2016; McQuown et al., 2017; Meier et al., 2017; Pradel et al., 2018; Elliott et al., 2019; Withrow et al., 2020) e a predisposição sexual não é atualmente confirmada (Williams et al., 2003; Polton et al., 2006; Polton e Brearley 2007; Knudsen et al., 2013; Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017; Pradel et al., 2018; Elliott et al., 2019).

Em relação ao fator racial, a predisposição é descrita principalmente nas raças Cocker Spaniel, Dachshund e Pastor Alemão (Williams et al., 2003; Polton et al., 2006; Polton e Brearley 2007; Polton et al., 2007; Daleck e Nardi, 2016; McQuown et al., 2017; Pradel et al., 2018; Elliott et al., 2019; Withrow et al., 2020). Em relação ao porte, o peso médio encontrado em diferentes estudos permanece entre 22 kg a 26 kg

demonstrando o acometimento principalmente em raças de médio porte (Turek et al., 2003; Williams et al., 2003; Palladino et al., 2016; McQuown et al., 2017; Meier et al., 2017; Chambers et al., 2020).

2.4.2. Manifestação e sinais clínicos

O carcinoma geralmente se desenvolve como um tumor perianal discreto (Daleck e Nardi, 2016) com massas intradérmicas e subcutâneas, firmemente fixadas ao redor do saco anal (Figura 7) (Williams et al., 2003; Raskin e Meyer, 2012; Meuten, 2017), perceptíveis somente à palpação retal (Withrow et al., 2020). Alguns casos podem cursar com massas externas de grandes dimensões, semelhantes as neoplasias de glândula hepatoide (Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017). Entretanto, as dimensões médias do tumor no momento do diagnóstico, avaliadas em estudos internacionais, variaram de 0,5 a 2,0cm (Turek et al., 2003; Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017; Pradel et al., 2018; Skorupski et al., 2018; Chambers et al., 2020) e as ulcerações são incomuns (Meuten, 2017). A manifestação é mais frequentemente unilateral com cerca de 7% a 14% dos casos ocorrendo de forma bilateral (Turek et al., 2003; Meier et al., 2017; Chambers et al., 2020; Withrow et al., 2020).



Figura 7. A/B: Pacientes caninos manifestando carcinoma de saco anal em manifestação típica. Diagnóstico confirmado mediante exame de histopatologia. Fonte: arquivo pessoal.

Em relação ao comportamento, a neoplasia apresenta agressividade local variável, com elevado potencial metastático (Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020). Sugere-se que no momento do diagnóstico inicial as metástases regionais já estejam presentes em cerca de 26% a 96% dos casos (Williams et al., 2003; Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020), e metástases a distância em 0 a 42% dos casos (Bennett et al., 2002; Withrow et al., 2020).

A disseminação ocorre principalmente pela via linfática em decorrência da importante vascularização encontrada nas submucosa dos sacos anais (Daleck e Nardi, 2016). O linfonodo sentinela pode variar entre os linfonodos do linfocentro ileossacral, porém na maior parte dos casos, será o linfonodo ilíaco interno, com casos atípicos realizando drenagem para os linfonodos inguinais (Penninck e D'anjou, 2015; Linden et al., 2019). Casos de skip metástases já foram relatados (Schlag et al., 2020). As metástases a distância ocorrem principalmente para os pulmões, fígado, baço e ossos (Bennett et al., 2002; Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020).

A síndrome paraneoplásica de hipercalcemia é amplamente relatada, com incidência que varia de 25% a 51% dos casos (Bennett et al., 2002; Williams et al., 2003; Daleck e Nardi, 2016; McQuown et al., 2017; Meier et al., 2017; Chambers et al., 2020; Withrow et al., 2020). Sua causa está relacionada principalmente a produção tumoral do peptídeo relacionado ao paratormônio (PTH-rP) que possui ação semelhante ao hormônio de mesmo nome (Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020), somado a citocinas que apresentam ação sinérgica como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF) (Daleck e Nardi, 2016).

Os sinais clínicos estão relacionados a presença da massa primária (manifestação clínica de disquesia, tenesmo, desconforto abdominal, sangramento, corrimento e lambadura local), ao aumento nos linfonodos regionais (constipação, fezes em formato anormal, estranguria, ataxia, dor local e paresia ou paralisia de membros), e relacionados a hipercalcemia (poliúria, polidipsia, hiporexia, letargia e êmese) (Bennett et al., 2002; Turek et al., 2003; Williams et al., 2003; Daleck e Nardi, 2016; McQuown et al., 2017; Meier et al., 2017; Pradel et al., 2018; Elliott et al., 2019; Withrow et al., 2020).

Outros sinais menos frequentes incluem o emagrecimento progressivo, inapetência, tosse, dispneia, febre e icterícia (Daleck e Nardi, 2016). Animais assintomáticos foram relatadas em até 50% dos casos (Bennett et al., 2002; Withrow et al., 2020) apesar de existirem resultados discordantes que demonstrem menores proporções (McQuown et al., 2017; Meier et al., 2017; Pradel et al., 2018).

2.4.3. Diagnóstico e estadiamento

A detecção das neoplasias de saco anal pode ser difícil em casos iniciais e assintomáticos, e dessa forma a palpação retal deve ser preconizada em quaisquer animais adultos, representando a primeira etapa do diagnóstico (Daleck e Nardi, 2016; Skorupski et al., 2018; Schlag et al., 2020; Withrow et al., 2020).

O exame de citologia pode auxiliar na suspeita diagnóstica e na exclusão de diagnósticos diferenciais (Raskin e Meyer, 2012; Daleck e Nardi, 2016). Os critérios de malignidade podem ser sutis ou ausentes (Withrow et al., 2020), e quando presentes, cita-se o pleomorfismo celular e nuclear, elevada relação núcleo-citoplasma e a presença de pequenos e múltiplos vacúolos citoplasmáticos (Raskin e Meyer, 2012; Daleck e Nardi, 2016).

Em todos os casos a confirmação diagnóstica deve ser realizada mediante exame histopatológico (Daleck e Nardi, 2016; Skorupski et al., 2018). Três padrões histológicos de arranjo celular podem ser observados, sendo classificados em padrão sólido; padrão tubular ou em roseta; e padrão papilar (Meuten, 2017; Withrow et al., 2020). Apesar de distintos, mais de um padrão pode estar presente em uma mesma neoplasia (Meuten, 2017). O padrão sólido tende a ser predominante, seguido pelo padrão de roseta e pelo padrão papilar (Pradel et al., 2018).

O exame de imunoistoquímica é pouco empregada com finalidade diagnóstica, considerando que na maioria dos casos o diagnóstico definitivo é obtido mediante exame histopatológico (Daleck e Nardi, 2016; Withrow et al., 2020). Entretanto, quando necessário podem ser associados os marcadores de origem epitelial, para identificar carcinomas, somado aos marcadores neuroendócrinos de Cromogranina A,

Sinaptofisina e Enolase neuroespecífica, comprovadamente expressos nesse tipo tumoral, com taxas de expressão variadas (Suzuki et al., 2013).

Exames complementares laboratoriais de hemograma, urinálise e perfil bioquímico sérico são indicados na investigação do estado clínico geral e de comorbidades que podem estar presentes (Daleck e Nardi, 2016). A avaliação do cálcio iônico associada a análise bioquímica é de extrema importância na identificação da síndrome de hipercalemia (Bennett et al., 2002; Williams et al., 2003; McQuown et al., 2017; Meier et al., 2017; Chambers et al., 2020).

Exames de imagem de radiografia torácica e ultrassonografia abdominal auxiliam na investigação de metástases e avaliação geral do paciente, porém possuem uma precisão limitada para a investigação dos linfonodos do linfocentro ileossacral (Pollard et al., 2017; Murphy et al., 2020). Dessa forma, os exames de tomografia computadorizada e ressonância magnética são as ferramentas mais indicadas para essa finalidade (Anderson et al., 2015; Jung et al., 2016; Palladino et al., 2016; Majeski et al., 2017; Pollard et al., 2017; Sutton et al., 2021).

Para o estadiamento clínico o modelo de classificação utilizado nas demais neoplasias cutâneas ou perianais é contraindicado (Daleck e Nardi, 2016). Dessa forma, Polton e Brearley (2007) propuseram um modelo de estadiamento (Tabela 1) que avalia não somente as dimensões do tumor primário, mas também as dimensões dos linfonodos, e a presença de metástases a distância. Este modelo é o mais utilizado e aceito na atualidade.

Tabela 1: Modelo para estadiamento do carcinoma de saco anal proposto por Polton e Brearley (2007).

Estádio clínico	T (tumor primário)	N (linfonodos)	M (metástase a distância)
I	Maior diâmetro <2,5cm	Linfonodo regional sem alteração	Ausente
II	Maior diâmetro > 2,5cm	Linfonodo regional sem alteração	Ausente
III a	Qualquer T	Linfonodo metastático com maior diâmetro <4,5cm	Ausente
III b	Qualquer T	Linfonodo metastático com maior diâmetro >4,5cm	Ausente
IV	Qualquer T	Qualquer N	Presente

Como diagnósticos diferenciais devem ser consideradas as condições não neoplásicas representadas principalmente pela saculite (Ragni, 2012; Jung et al., 2016), e as condições neoplásicas, principalmente pelas neoplasias de glândula hepatoide, bem como outras neoplasias cutâneas em acometimento perianal, como os mastocitomas, sarcomas e linfomas (Daleck e Nardi, 2016; Withrow et al., 2020). Outros tipos neoplásicos também podem se desenvolver nos sacos anais, de origem nos melanócitos presentes e no epitélio escamoso que reveste os ductos excretórios, com casos descritos de melanomas e carcinomas de células escamosas de sacos anais (Esplin et al., 2003; Mellett et al., 2015; Vinayak et al., 2017; Ahn et al., 2019).

2.4.4. Tratamento

O tratamento dos carcinomas de saco anal, na maior parte dos casos se inicia com a excisão cirúrgica, que permanece como técnica de eleição, podendo ser posteriormente associada a técnicas adjuvantes sistêmicas (Polton e Brearley 2007; Potanas et al., 2015; Daleck e Nardi, 2016; Barnes e Demetriou, 2017; Banerjee et al., 2018; Skorupski et al., 2018; Chambers et al., 2020; Withrow et al., 2020; Mickelson, 2022).

A excisão do tumor primário tem como principal fator de complicação a região acometida, devido a íntima relação dos sacos anais com o reto, esfíncter anal externo e estruturas neurovasculares regionais. No entanto, quando em dimensões pequenas, a maioria dos casos permite a ressecção completa (Daleck e Nardi, 2016; Barnes e Demetriou, 2017; Withrow et al., 2020).

Quando corretamente executada, e na ausência de complicações transcirúrgicas, a técnica de saculectomia anal fechada é bem tolerada, e está associada a baixas taxas de complicações pós cirúrgicas (Serman et al., 2021; Chen et al., 2022). Quando presentes, as complicações incluem principalmente a deiscência de ferida, perfuração retal, fistulação retocutânea, infecção e incontinência fecal transitória ou permanente (Withrow et al., 2020). Casos de hipocalcemia após a ressecção cirúrgica já foram relatados, com risco aparentemente maior em pacientes que apresentam hipercalcemia previa ao tratamento (Olsen e Sumner, 2019).

Apesar dos desafios relacionados a localização anatômica, as taxas de recorrência após a remoção cirúrgica tendem a ser baixas, de aproximadamente 8% quando há margens cirúrgicas livres e 25% quando há margens cirúrgicas comprometidas. Casos associados a invasão vascular ou linfática apresentam taxas mais elevadas. Alguns casos podem cursar com posterior acometimento da glândula contralateral (Barnes e Demetriou, 2017; Sterman et al., 2021).

A linfadenectomia associada é indicada quando há suspeita do envolvimento linfático regional mediante exames de imagem, sendo de difícil execução na ausência de aumento linfonodal (Wouda et al., 2016; Daleck e Nardi, 2016; Withrow et al., 2020; Tanis et al., 2022).

Apesar de ainda se tratar de uma modalidade pouco acessível no Brasil, cabe ressaltar que a radioterapia tem seu emprego com função paliativa, como parte de protocolos multimodais e com finalidade curativa como terapia única (Polton e Brearley 2007; Daleck e Nardi, 2016; Pradel et al., 2018; Withrow et al., 2020) com evidências de sua segurança de aplicação e boas taxas de respostas (Turek et al., 2003; McQuown et al., 2017; Meier et al., 2017; Williams et al., 2021). Seu uso também é descrito no tratamento de metástases em linfonodos (McQuown et al., 2017; Meier et al., 2017).

O uso de terapias sistêmicas deve ser considerado com o objetivo de prevenção de doença metastática ou recidivas, considerando o comportamento agressivo da doença; ou buscando o controle de doença macroscópica em casos inoperáveis (Daleck e Nardi, 2016).

Considerando as modalidades sistêmicas de tratamento, a quimioterapia permanece como técnica mais empregada, entretanto a sua real eficácia ainda é controversa na literatura (Wouda et al., 2016; Withrow et al., 2020; Mickelson, 2022; Tanis et al., 2022). São relatados diversos protocolos utilizando a carboplatina, cisplatina, actinomicina D, 5-fluoracila, vincristina, ciclofosfamida, mitoxantrona, melfalano, doxorubicina, epirubicina, gencitabina e clorambucil (Bennett et al., 2002; Turek et al., 2003; Williams et al., 2003; Polton e Brearley 2007; Potanas et al., 2015; Daleck e Nardi, 2016; Banerjee et al., 2018; Pradel et al., 2018; Withrow et al., 2020). Casos em que exista a comprovação da disseminação a distância têm indicação de

quimioterapia (Bennett et al., 2002; Potanas et al., 2015; Withrow et al., 2020), com relatos do seu uso como terapia única (Williams et al., 2003).

Os inibidores de tirosina quinase tem seu uso recomendado, considerando a expressão já comprovada de PDGFr e VEGFr, apesar da ausência de expressão de KIT nesse tipo tumoral (Urie et al., 2012). Sua eficácia e segurança de uso já foram amplamente comprovadas, com taxas de resposta satisfatórias (Urie et al., 2012; Elliott et al., 2019; Heaton et al., 2020; Withrow et al., 2020)

Outras modalidades descritas a eletroquimioterapia adjuvante (Spugnini et al., 2008; Valenti et al., 2021), a quimioterapia metronômica e os inibidores de ciclo-oxigenase-2 (COX2) (Daleck e Nardi, 2016; Teixeira et al., 2016; Withrow et al., 2020).

O uso da terapia alvo molecular com foco nos receptores HER2, representa uma possibilidade adicional no manejo terapêutico desses casos. No entanto, essa modalidade ainda não é empregada de forma rotineira, sendo foco de diversos estudos (Loibl e Gianni, 2016; Sakai et al., 2018; García et al., 2020; Tanaka et al., 2020).

Independente da modalidade terapêutica realizada, o acompanhamento periódico é recomendado ao final do tratamento para controle de recidivas e desenvolvimento de novos focos tumorais, no entanto a taxa de adesão por parte dos tutores ainda é considerada baixa (Chambers et al., 2020).

2.4.5. Prognóstico

O prognóstico varia de reservado a desfavorável, devido ao comportamento agressivo geralmente associado a neoplasia (Daleck e Nardi, 2016), com tempo de sobrevida descrito entre 0 e 1873 dias, relacionado aos diversos protocolos terapêuticos e estádios clínicos (Williams et al., 2003; Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020).

Fatores prognósticos clínicos incluem o diâmetro tumoral, a presença de metástases regionais e a distância, e a presença de hipercalcemia paraneoplásica (Wouda et al., 2016; Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017; Pradel et al., 2018; Withrow

et al., 2020). As características histológicas do tumor também têm sido descritas com importante valor prognóstico associado ao padrão histológico (sólido ou não sólido); a presença ou ausência de necrose; e a presença ou ausência de invasão vascular, enquanto o índice mitótico não demonstrou importância prognóstica (Pradel et al., 2018; Morello et al., 2021; Wong et al., 2021).

Outros fatores associados a marcadores moleculares se encontram em fase de estudo quanto a sua expressão e seu valor prognóstico nos tumores de saco anal (Polton et al., 2007; Brown et al., 2012; Knudsen et al., 2013; Pradel et al., 2018; Withrow et al., 2020). O marcador de proliferação celular Ki67 tem a sua imunoexpressão já descrita nos sacos anais (Suzuki et al., 2013; Pereira et al., 2013), porém são observados valores divergentes entre os diferentes estudos, não havendo ainda uma forma de avaliação prognóstica bem definida em relação a sua marcação quantitativa (Skorupski et al., 2018; Morello et al., 2021; Wong et al., 2021).

A COX-2, amplamente estudada na medicina humana e na veterinária, é comprovadamente expressa nos carcinomas de saco anal, com valor prognóstico ainda não estabelecido (Knudsen et al., 2013; Withrow et al., 2020). O receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR- β) e receptor kit foram avaliados em estudo qualitativo, e enquanto kit se mostrou negativo, a proteína PDGFR- β foi considerada expressa no tumor (Brown et al., 2012). A proteína E-caderina já foi identificada através da técnica de imunoistoquímica, e tem sido associada a piores prognósticos (Polton et al., 2007; Withrow et al., 2020). Por fim, a proteína p53 foi identificada, também por técnica de imunoistoquímica, com expressão baixa a moderada, porém ainda sem associação a implicações clínicas (Withrow et al., 2020).

A investigação molecular da neoplasia é essencial na tentativa de consolidar os fatores prognósticos já avaliados, e identificar possíveis alvos terapêuticos.

3. REFERÊNCIAS

Ahn SM, Cho KO, Kim SK, Jung DI, Yu D (2019). Malignant Anal Sac Melanoma in a Dog. **Journal of Veterinary Clinics** 36(6): 349-352.

Anderson CL, MacKay CS, Roberts GD, Fidel J (2015). Comparison of abdominal ultrasound and magnetic resonance imaging for detection of abdominal lymphadenopathy in dogs with metastatic apocrine gland adenocarcinoma of the anal sac. **Veterinary and Comparative Oncology** 13(2): 98-105.

Banerjee A, Shee A, Tripathi S, Biswas P, Soren S, Islam M (2018) Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in dogs with anal sac gland carcinoma. **Journal of Entomology and Zoology Studies** 6(2): 2934-2936.

Barnes DC, Demetriou JL (2017) Surgical management of primary, metastatic and recurrent anal sac adenocarcinoma in the dog: 52 cases. **Journal of Small Animal Practice** 58(5): 263-268.

Bennett PF, DeNicola DB, Patty Bonney P, Glickman NW, Knapp DW (2002) Canine anal sac adenocarcinomas: clinical presentation and response to therapy. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 16(1): 100-104.

Bergeron CC, Costa MC, de Souza LB, Sauvé F (2021). Description of the bacterial microbiota of anal sacs in healthy dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research** 85(1): 12-17.

Bergin IL, Smedley RC, Esplin DG, Spangler WL, Kiupel M (2011) Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. **Veterinary Pathology** 48:41–53.

Berlato D, Murphy S, Monti P, Stewart J, Newton JR, Flindall A, Maglennon GA (2015) Comparison of mitotic index and Ki67 index in the prognostication of canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary and Comparative Oncology** 13:143–150.

Booth DG, Earnshaw WC (2017) Ki-67 and the chromosome periphery compartment in mitosis. **Trends in Cell Biology** 27(12): 906-916.

Brodzki A, Łopuszyński W, Millan Y, Tatara MR, Brodzki P, Kulpa K, Minakow N (2021) Androgen and Estrogen Receptor Expression in Different Types of Perianal Gland Tumors in Male Dogs. **Animals** 11(3): 875.

Brown DC, Gatter KC (2002) Ki67 protein: the immaculate deception? **Histopathology** 40(1): 2-11.

- Brown RJ, Newman SJ, Durtschi DC, LeBlanc AK (2012) Expression of PDGFR- β and Kit in canine anal sac apocrine gland adenocarcinoma using tissue immunohistochemistry. **Veterinary and Comparative Oncology** 10(1): 74-79.
- Brunetti B, Bacci B, Sarli G, Pancioni E, Muscatello LV (2021) Immunohistochemical Screening of HER2 in Canine Carcinomas: A Preliminary Study. **Animals** 11(4): 1006.
- Buishand, FO, Kik M, Kirpensteijn J (2010) Evaluation of clinicopathological criteria and the Ki67 index as prognostic indicators in canine insulinoma. **The Veterinary Journal** 185: 62-67.
- Chambers AR, Skinner OT, Mickelson MA, Schlag AN, Butler JR, Wallace ML, Moyer AL, Vinayak A, Samuel N, Kennedy KC, Oakes KE, Scharf VF, Parker LA, Wustefeld-Janssens BG (2020) Adherence to follow-up recommendations for dogs with apocrine gland anal sac adenocarcinoma: A multicentre retrospective study. **Veterinary and Comparative Oncology** 18(4): 683-688.
- Chen CL, Lapsley JM, Selmic LE (2022) Minimal complications observed with a modified surgical approach for treatment of canine anal sac neoplasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 260(S1): S59-S64.
- Daleck CR, Nardi AB (2^a ed.) (2016) Oncologia em Cães e Gatos. São Paulo: Roca; 1075p.
- De Las Mulas M, Ordás J, Millán Y, Fernández-Soria V, Cajal, SR (2003) Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas. **Breast Cancer Research and Treatment** 80(3): 363-367.
- Duijkeren EV (1995) Disease conditions of canine anal sacs. **Journal of Small Animal Practice** 36(1): 12-16.
- Doyle HA, Gee RJ, Masters TD, Gee CR, Booth CJ, Peterson-Roth E, Koskic RA, Helfandd SC, Pricee L, Bascombef D, Jacksonf D, Hof R, Postbf GR, Mamulaa MJ (2021) Vaccine-induced ErbB (EGFR/HER2) specific immunity in spontaneous canine cancer. **Translational Oncology** 14(11): 101205.

Elliott JW (2019) Response and outcome following toceranib phosphate treatment for stage four anal sac apocrine gland adenocarcinoma in dogs: 15 cases (2013–2017). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 254(8): 960-966.

Endl E, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. **Experimental Cell Research** 257(2): 231-237.

Esplin DG, Wilson SR, Hullinger GA (2003). Squamous cell carcinoma of the anal sac in five dogs. **Veterinary Pathology** 40(3): 332-334.

Flint AF, U'ren, L, Legare ME, Withrow SJ, Dernell W, Hanneman WH (2004) Overexpression of the erbB-2 proto-oncogene in canine osteosarcoma cell lines and tumors. **Veterinary Pathology** 41(3): 291-296.

Freitas CS (2007) Estendendo o Conhecimento sobre a Família Her-Receptores para o Fator de Crescimento Epidérmico e seus ligantes às Malignidades Hematológicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 54(1): 79-86.

García JMC, Murillo CEG, Jaramillo MR (2020). EGFR and HER2 small molecules inhibitors as potential therapeutics in veterinary oncology. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas** 49(2): 452-471.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **International Journal of Cancer** 31:13–20.

Gil RS, Vagnarelli P (2018) Ki-67: More Hidden behind a 'Classic Proliferation Marker'. **Trends in Biochemical Sciences** 43(10): 747-748.

Gutierrez C, Schiff R (2011) HER2: biology, detection, and clinical implications. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine** 135(1): 55-62.

Heaton CM, Fernandes AF, Jark PC, Pan X (2020). Evaluation of toceranib for treatment of apocrine gland anal sac adenocarcinoma in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 34(2): 873-881.

Hill's Atlas of Veterinary Clinical Anatomy (2004). Veterinary Medicine Publishing Company Inc, 96p.

Hsu WL, Huang HM, Liao JW, Wong ML, Chang SC (2009) Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. **The Veterinary Journal** 180(1): 116-123.

Hsu JL, Hung MC (2016) The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cancer. **Cancer and Metastasis Reviews** 35(4): 575-588.

Hynes NE, Stern DF (1994) The biology of erbB-2/nue/HER-2 and its role in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta** 1198(2-3): 165-184.

Jung Y, Jeong E, Park S, Jeong J, Choi US, Kim MS, Kim N, Lee K (2016) Diagnostic imaging features of normal anal sacs in dogs and cats. **Journal of Veterinary Science** 17(3): 331-335.

Knudsen CS, Williams A, Brearley MJ, Demetriou JL (2013) COX-2 expression in canine anal sac adenocarcinomas and in non-neoplastic canine anal sacs. **The Veterinary Journal** 197(3): 782-787.

Krishnamurti U, Silverman JF (2014) HER2 in breast cancer: a review and update. **Advances in Anatomic Pathology** 21(2): 100-107.

Linden DS, Cole R, Tillson DM, Boothe HW, Matz BM (2019) Sentinel lymph node mapping of the canine anal sac using lymphoscintigraphy: A pilot study. **Veterinary Radiology & Ultrasound** 60(3): 346-350.

Loibl S, Gianni L (2016) HER2-positive breast cancer. **The Lancet** 389(10087): 2415-2429.

Lorch G, Sivaprakasam K, Zismann V, Perdignes N, Contente-Cuomo T, Nazareno A, Facista S, Wong S, Drenner K, Liang WS, Amann JM, Sinicropi-Yao SL, Koenig MJ, La Perle K, Whitsett TG, Murtaza M, Trent JM, Carbone DP, Hendricks WPD (2019) Identification of recurrent activating HER2 mutations in primary canine pulmonary adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research** 25(19): 5866-5877.

Maeda S, Sakai K, Kaji K, Iio A, Nakazawa M, Motegi T, Yonezawa T, Momoi Y (2022) Lapatinib as first-line treatment for muscle-invasive urothelial carcinoma in dogs. **Scientific Reports** 12(1):1-10.

Majeski SA, Steffey MA, Fuller M, Hunt GB, Mayhew PD, Pollard RE (2017). Indirect computed tomographic lymphography for iliosacral lymphatic mapping in a cohort of dogs with anal sac gland adenocarcinoma: technique description. **Veterinary Radiology & Ultrasound** 58(3): 295-303.

Majumder A, Sandhu M, Banerji D, Steri V, Olshen A, Moasser MM (2021) The role of HER2 and HER3 in HER2-amplified cancers beyond breast cancers. **Scientific Reports** 11(1): 1-11.

Mason NJ, Gnanandarajah JS, Engiles JB, Gray F, Laughlin D, Gaurnier-Hausser A, Wallecha A, Huebner M, Paterson Y (2016) Immunotherapy with a HER2-targeting listeria induces HER2-specific immunity and demonstrates potential therapeutic effects in a phase I trial in canine osteosarcoma. **Clinical Cancer Research** 22(17):4380-4390.

McQuown B, Keyerleber MA, Rosen K, McEntee MC, Burgess KE (2017) Treatment of advanced canine anal sac adenocarcinoma with hypofractionated radiation therapy: 77 cases (1999–2013). **Veterinary and Comparative Oncology** 15(3): 840-851.

Meier V, Polton G, Cancedda S, Roos M, Laganga P, Emmerson T, Bley CR (2017) Outcome in dogs with advanced (stage 3b) anal sac gland carcinoma treated with surgery or hypofractionated radiation therapy. **Veterinary and Comparative Oncology** 15(3): 1073-1086.

Mellet S, Verganti S, Murphy S, Bowl K (2015). Squamous cell carcinoma of the anal sacs in three dogs. **Journal of Small Animal Practice** 56(3): 223-225.

Menona SS, Guruvayoorappanb C, Sakthivelc KM, Rasmi RR (2019) Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. **Clinica Chimica Acta** 491:39-45.

Meuten DJ (5^a ed.) (2017) Tumors in domestic animals. Ames: John Wiley & Sons Inc, 989p.

Mickelson MA (2022) Updated Concepts in Oncologic Surgery: Apocrine Gland Anal Sac Adenocarcinoma and Mast Cell Tumors. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice** 52(2): 549-580.

- Millanta F, Calandrella M, Citi S, Della Santa D, Poli A (2005) Overexpression of HER-2 in feline invasive mammary carcinomas: an immunohistochemical survey and evaluation of its prognostic potential. **Veterinary Pathology** 42(1): 30-34.
- Miller, I Min M, Yang C, Tian C, Gookin S, Carter D, Spencer SL (2018) Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence. **Cell Reports** 24(5): 1105-1112.
- Moasser MM (2007) The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. **Oncogene** 26(45): 6469-6487.
- Morello EM, Cino M, Giacobino D, Nicoletti A, Iussich S, Buracco P, Martano M (2021) Prognostic Value of Ki67 and Other Clinical and Histopathological Factors in Canine Apocrine Gland Anal Sac Adenocarcinoma. **Animals** 11(6): 1649.
- Murphy MC, Sullivan M, Gomes BJ, Kaczmarska A, Hammond GJ (2020). Evaluation of radiographs for the detection of sublumbar lymphadenopathy in dogs. **The Canadian Veterinary Journal** 61(7): 749.
- Musser ML, Berger EP, Tripp CD, Clifford CA, Bergman PJ, Johannes CM (2021) Safety evaluation of the canine osteosarcoma vaccine, live *Listeria* vector. **Veterinary and Comparative Oncology** 19(1): 92-98.
- Olsen JA, Sumner JP (2019). Clinical hypocalcemia following surgical resection of apocrine gland anal-sac adenocarcinomas in 3 dogs. **The Canadian Veterinary Journal** 60(6): 591.
- Palladino S, Keyerleber MA, King RG, Burgess KE (2016) Utility of computed tomography versus abdominal ultrasound examination to identify iliosacral lymphadenomegaly in dogs with apocrine gland adenocarcinoma of the anal sac. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 30(6): 1858-1863.
- Peña L, Gama A, Goldschmidt MH, Abadie J, Benazzi C, Castagnaro M, Díez L, Gärtner F, Hellmén E, Kiupel M, Millán Y, Miller MA, Nguyen F, Poli A, Sarli G, Zappulli V, las Mulas JM (2014) Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone

receptor assessment using immunohistochemistry. **Veterinary Pathology** 51(1): 127-145.

Penninck D, D'anjou MA (2 ed.) (2015) Atlas of Small Animal Ultrasonography. Ames: John Wiley & Sons Inc.; p.571.

Pereira RS, Schweigert A, Melo GD, Fernandes FV, Sueiro FAR, Machado GF (2013) Ki-67 labeling in canine perianal glands neoplasms: a novel approach for immunohistological diagnostic and prognostic. **BMC Veterinary Research** 9(1): 1-7.

Perez EA, Cortés J, Gonzalez-Ângulo AM, Bartlett JMS (2014) HER2 testing: Current status and future directions. **Cancer Treatment Reviews** 40(2014): 276-284.

Pollard RE, Fuller MC, Steffey MA (2017) Ultrasound and computed tomography of the iliosacral lymphatic centre in dogs with anal sac gland carcinoma. **Veterinary and Comparative Oncology** 15(2): 299-306.

Polton GA, Mowat V, Lee HC, Mckee KA, Scase TJ (2006) Breed, gender and neutering status of British dogs with anal sac gland carcinoma. **Veterinary and Comparative Oncology** 4(3): 125-131.

Polton GA, Brearley MJ (2007) Clinical stage, therapy, and prognosis in canine anal sac gland carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 21(2): 274-280.

Polton GA, Brearley MJ, Green LM, Scase TJ (2007) Expression of E-cadherin in canine anal sac gland carcinoma and its association with survival. **Veterinary and Comparative Oncology** 5(4): 232-238.

Potanas CP, Padgett S, Gamblin RM (2015) Surgical excision of anal sac apocrine gland adenocarcinomas with and without adjunctive chemotherapy in dogs: 42 cases (2005–2011). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 246(8): 877-884.

Pradel J, Berlato D, Dobromylskyj M, Rasotto R (2018) Prognostic significance of histopathology in canine anal sac gland adenocarcinomas: preliminary results in a retrospective study of 39 cases. **Veterinary and Comparative Oncology** 16(4): 518-528.

Ragni RA (2012) Anal sac disease and its surgical treatment. **UK Vet Companion Animal** 17(6): 17-25.

Raskin RE, Meyer DJ (2^a ed.) (2012) Canine and Feline Cytology: A Color Atlas and Interpretation. São Paulo: Elsevier, 976p.

Ressel L, Puleio R, Loria GR, Vannozzi I, Millanta F, Caracappa S, Poli A (2013) HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. **Research in Veterinary Science** 94(2): 299-305.

Sakai K, Maeda S, Saeki K, Nakagawa T, Murakami M, Endo Y, Yonezawa T, Kadosawa T, Mori T, Nishimura R, Matsuki N (2018) Anti-tumour effect of lapatinib in canine transitional cell carcinoma cell lines. **Veterinary and Comparative Oncology** 16(4): 642-649.

Scaltriti M, Verma C, Guzman M, Jimenez J, Parra JL, Pedersen K, Smith DJ, Landolfi S, Cajal SR, Arribas J, Baselga J (2009) Lapatinib, a HER2 tyrosine kinase inhibitor, induces stabilization and accumulation of HER2 and potentiates trastuzumab-dependent cell cytotoxicity. **Oncogene** 28:803-814.

Schlag AN, Johnson T, Vinayak A, Kuvaldina A, Skinner OT, Wustefeld-Janssens BG (2020) Comparison of methods to determine primary tumour size in canine apocrine gland anal sac adenocarcinoma. **Journal of Small Animal Practice** 61(3): 185-189.

Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology** 182(3): 311-322.

Skorupski KA, Alarcón CN, Lorimier, LP, LaDouceur EEB, Rodriguez CO, Rebhun RB (2018) Outcome and clinical, pathological, and immunohistochemical factors associated with prognosis for dogs with early-stage anal sac adenocarcinoma treated with surgery alone: 34 cases (2002–2013). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 253(1): 84-91.

Sobecki M, Mrouj K, Colinge J, Gerbe F, Jay P, Krasinska L, Dulic V, Fisher D (2017) Cell-cycle regulation accounts for variability in Ki-67 expression levels. **Cancer Research** 77(10): 2722-2734.

Spugnini EP, Dotsinsky I, Mudrov N, Bufalini M, Giannini G, Citro G, Feroce F, Baldi A (2008) Adjuvant electrochemotherapy for incompletely excised anal sac carcinoma in a dog. **In vivo** 22(1): 47-49.

Sterman A, Butler JR, Chambers A, Dickson R, Dornbusch J, Mickelson M, Selmic L, Scharf V, Schlag A, Skinner O, Vinayak A, Janssens BW (2021) Post-operative complications following apocrine gland anal sac adenocarcinoma resection in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology** 19(4): 743-749.

Sun X, Kaufman PD (2018) Ki-67: more than a proliferation marker. **Chromosoma** 127(2): 175-186.

Sutton DR, Hernon T, Hezzell MJ, Meakin LB, Gould SM, Bradley KJ, Major AC (2022) Computed tomographic staging of dogs with anal sac adenocarcinoma. **Journal of Small Animal Practice** 63(1): 27-33.

Suzuki K, Morita R, Hojo Y, Nomura K, Shibutani M, Mitsumori K (2013) Immunohistochemical characterization of neuroendocrine differentiation of canine anal sac glandular tumours. **Journal of Comparative Pathology** 149(2-3): 199-207.

Tanaka Y, Watanabe M, Saeki K, Ong SM, Yoshitake R, Imamura S, Nishimura R, Sugano S, Nakagawa T (2020) Evaluation of the proper dosage of lapatinib and its safety in dogs. **Translational and Regulatory Sciences** 2(3): 68-71.

Tanis JB, Simlett-Moss AB, Ossowska M, Maddox TW, Guillem J, Lopez-Jimenez C, Polton G, Burrow R, Finotello R (2022). Canine anal sac gland carcinoma with regional lymph node metastases treated with saccullectomy and lymphadenectomy: Outcome and possible prognostic factors. **Veterinary and Comparative Oncology** 20(1): 276-292.

Tao Li L, Jiang G, Chen Q, Zheng JN (2015) Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer. **Molecular Medicine Reports** 11(3), 1566-1572.

Teixeira NCT, Bicalho APCV, Vasconcelos AV, Horta RS, Cunha RMC, Lavallo GE (2016) Cyclooxygenase inhibitor and metronomic chemotherapy association for the treatment of metastatic anal sac carcinoma in dog: case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 68(4): 913-918.

Terragni R, Casadei Gardini AC, Sabattini S, Bettini G, Amadori D, Talamonti C, Vignoli M, Capelli L, Saunders JH, Ricci M, Ulivi P (2014) EGFR, HER-2 and KRAS in canine gastric epithelial tumors: a potential human model. **PLOS one** 9(1): e85388.

Tsuboi M, Sakai K, Maeda S, Chambers JK, Yonezawa T, Matsuki N, Uchida K, Nakayama H (2019) Assessment of HER2 expression in canine urothelial carcinoma of the urinary bladder. **Veterinary Pathology** 56(3): 369-376.

Turek MM, Forrest LJ, Adams WM, Helfand SC, Vail DM (2003) Postoperative radiotherapy and mitoxantrone for anal sac adenocarcinoma in the dog: 15 cases (1991–2001). **Veterinary and Comparative Oncology** 1(2): 94-104.

Urie BK, Russell DS, Kisseberth WC, London CA (2012) Evaluation of expression and function of vascular endothelial growth factor receptor 2, platelet derived growth factor receptors-alpha and -beta, KIT, and RET in canine apocrine gland anal sac adenocarcinoma and thyroid carcinoma. **Veterinary Research** 8(67): 2-9.

Valenti P, Menicagli F, Baldi A, Barella G, Catalucci C, Attorri V, Spugnini EP (2021) Evaluation of electrochemotherapy in the management of apocrine gland anal sac adenocarcinomas in dogs: A retrospective study. **Open Veterinary Journal** 11(1): 100-106.

Vinayak A, Frank CB, Gardiner DW, Thieman-Mankin KM, Worley DR (2017). Malignant anal sac melanoma in dogs: eleven cases (2000 to 2015). **Journal of Small Animal Practice** 58(4): 231-237.

Williams LE, Gliatto JM, Dodge RK, Johnson JL, Gamblin RM, Thamm DH, Lana SE, Szymkowski M, Moore AS (2003) Carcinoma of the apocrine glands of the anal sac in dogs: 113 cases (1985–1995). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 223(6): 825-831.

Williams C, Parys M, Handel I, Serra JC, Lawrence J (2021) Minimal late radiation toxicity and transient early toxicity following postoperative definitive intent conformal radiation therapy (20× 2.5 Gy) for canine apocrine gland anal sac adenocarcinoma. **Veterinary Radiology & Ultrasound** 63(2): 224-233.

Withrow SJ, Vail DM, Page RL (6^a ed.) (2020) Small Animal Clinical Oncology. St. Louis: Elsevier, 842p.

Wong H, Byrne S, Rasotto R, Drees R, Taylor A, Priestnall SL, Leo C (2021) A Retrospective Study of Clinical and Histopathological Features of 81 Cases of Canine Apocrine Gland Adenocarcinoma of the Anal Sac: Independent Clinical and Histopathological Risk Factors Associated with Outcome. **Animals** 11(11): 3327.

Wouda RM, Borrego J, Keuler NS, Stein T (2016) Evaluation of adjuvant carboplatin chemotherapy in the management of surgically excised anal sac apocrine gland adenocarcinoma in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology** 14(1): 67-80.

Yan M, Schwaederle M, Arguello D, Millis SZ, Gatalica Z, Kurzrock R (2015) HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. **Cancer and Metastasis Reviews** 34(1): 157-164.

Yang C, Zhang J, Ding M, Xu K, Li L, Mao L, Zheng J (2017) Ki67 targeted strategies for cancer therapy. **Clinical and Translational Oncology** 20(5): 570-575.

Yarden Y (2001) Biology of HER2 and its importance in breast cancer. **Oncology** 61(2): 1-13.

Yoshimoto S, Kato D, Kamoto S, Yamamoto K, Tsuboi M, Shinada M, Ikeda N, Tanaka Y, Yoshitake R, Eto S, Saeki K, Chambers JK, Kinoshita R, Uchida K, Nishimura R, Nakagawa T (2019a) Detection of human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in canine anal sac gland carcinoma. **Journal of Veterinary Medical Science** 81(7): 1034-1039.

Yoshimoto S, Kato D, Kamoto S, Yamamoto K, Tsuboi M, Shinada M, Ikeda N, Tanaka Y, Yoshitake R, Eto S, Saeki K, Chambers JK, Kinoshita R, Uchida K, Nishimura R, Nakagawa T (2019b) Immunohistochemical evaluation of HER2 expression in canine thyroid carcinoma. **Heliyon** 5(7): e02004.

Yoshimoto S, Kato D, Kamoto S, Yamamoto K, Tsuboi M, Shinada M, Ikeda N, Tanaka Y, Yoshitake R, Eto S, Saeki K, Chambers JK, Hashimoto Y, Uchida K, Nishimura R, Nakagawa T (2020) Overexpression of human epidermal growth factor receptor 2 in canine primary lung cancer. **Journal of Veterinary Medical Science** 82(6): 804-808.

CAPÍTULO 2 – Estudo retrospectivo do carcinoma de saco anal canino no Brasil: 260 casos

Resumo: As neoplasias de saco anal possuem incidência importante nos animais de companhia. Os carcinomas de saco anal correspondem a 17% dos tumores na região perianal, e 2% de todas as neoplasias cutâneas na espécie canina, enquanto em felinos a incidência é rara. A variante benigna é pouco diagnosticada em ambas as espécies. O perfil epidemiológico de acometimento já foi amplamente descrito em estudos internacionais, entretanto dados nacionais ainda são escassos. Observa-se principalmente o acometimento de animais em idade avançada, sem uma predisposição sexual confirmada, com predisposição descrita principalmente nas raças Dachshund, Cocker Spaniel e Pastor Alemão. O objetivo do presente trabalho foi avaliar, de forma retrospectiva, os casos de caninos com carcinoma de saco anal, avaliando o perfil de acometimento e o tamanho tumoral no momento do diagnóstico. Foi obtido um N de 260 casos, respectivo a um período de 12 anos (2010 – 2021), proveniente do banco de dados do laboratório parceiro. Foram descritos os dados acerca do sexo, idade, raça e tamanho tumoral no momento do diagnóstico. Os dados foram avaliados mediante análise estatística descritiva simples. Foi encontrado um maior acometimento em animais adultos a idosos, do sexo feminino e sem raça definida, evidenciando diferenças em relação a estudos internacionais, que podem ser atribuídas a fatores socioculturais. Em relação ao tamanho tumoral, observou-se que os tumores frequentemente são diagnosticados já com dimensões elevadas, ressaltando assim a importância do exame de palpação retal durante a avaliação física geral de pacientes caninos, principalmente em idade avançada.

Palavras-Chave: adenocarcinoma apócrino do saco anal, epidemiologia, neoplasia.

1. Introdução

As neoplasias de saco anal têm origem nas glândulas apócrinas localizadas no interior dos sacos anais, e possuem incidência significativa nos animais de companhia. Os carcinomas de saco anal correspondem a 17% dos tumores na região

perianal, e 2% de todas as neoplasias cutâneas na espécie canina (Meuten, 2017; Withrow et al., 2020), entretanto são raros nos felinos. Os adenomas são pouco frequentes em ambas as espécies (Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020).

Seu desenvolvimento é inicialmente discreto, com massas intradérmicas e subcutâneas perceptíveis somente à palpação retal, com os casos mais avançados formando massas externas de grandes dimensões e aspectos variados (Williams et al., 2003; Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020). Em relação ao comportamento, a neoplasia apresenta agressividade local variável, porém, com elevado potencial metastático, com cerca de 26% a 96% dos casos cursando com metástase local, e 0 a 42% dos casos com metástase à distância, desde o momento do diagnóstico inicial (Bennett et al., 2002; Williams et al., 2003; Meuten, 2017). O tratamento de eleição consiste na excisão cirúrgica, podendo ser posteriormente associada a técnicas adjuvantes de quimioterapia, radioterapia, eletroquimioterapia, terapia alvo molecular e inibidores de ciclooxygenase-2 (Potanas et al., 2015; Barnes e Demetriou, 2017; Chambers et al., 2020; Heaton et al., 2020; Withrow et al., 2020). Fatores prognósticos descritos incluem o estadiamento clínico, diâmetro tumoral, presença de metástases regionais e a distância, presença de hipercalcemia paraneoplásica e características histológicas do tumor (Daleck e Nardi, 2016; Wouda et al., 2016; Meuten, 2017; Pradel et al., 2018; Withrow et al., 2020).

O perfil epidemiológico, descrito em estudos internacionais, envolve principalmente animais adultos e idosos (Williams et al., 2003; Polton e Brearley, 2007; Polton et al., 2007; Knudsen et al., 2013; Palladino et al., 2016; McQuown et al., 2017; Meier et al., 2017; Pradel et al., 2018; Elliott, 2019) sem uma predisposição sexual confirmada (Williams et al., 2003; Polton et al., 2006; Polton e Brearley, 2007; Polton et al., 2007; Knudsen et al., 2013; Pradel et al., 2018; Elliott, 2019). Em relação ao fator racial, a predisposição é descrita principalmente nas raças Dachshund, Cocker Spaniel e Pastor Alemão (Williams et al., 2003; Polton et al., 2006; Polton e Brearley, 2007; Polton et al., 2007; McQuown et al., 2017; Pradel et al., 2018; Elliott, 2019), e em animais de peso médio entre 22 kg a 26 kg demonstrando o acometimento principalmente em raças de médio porte (Turek et al., 2003; Williams et al., 2003; Palladino et al., 2016; McQuown et al., 2017; Meier et al., 2017; Schlag et al., 2020).

Não há, até o momento, estudos que descrevam o perfil epidemiológico em território brasileiro, que pode variar de estudos internacionais, considerando os aspectos socioculturais do país.

O presente trabalho, tem o objetivo de descrever o perfil epidemiológico encontrado em pacientes caninos manifestando carcinomas de saco anal, bem como descrever o tamanho tumoral observado no momento do diagnóstico.

2. Material e métodos

Foi analisado o banco de dados do laboratório Vetpat - Campinas, correspondente a um período de 12 anos (2010 – 2021), mediante busca simples no sistema operacional do laboratório. Foi realizado um levantamento retrospectivo dos casos de caninos com diagnóstico histopatológico de carcinoma de saco anal, sendo esse o único critério de inclusão. Como critérios de exclusão foram considerados casos em que não houve a confirmação do diagnóstico, bem como os demais tipos neoplásicos e as demais espécies animais.

Foram coletadas as informações acerca da raça, sexo, idade e tamanho tumoral em avaliação histopatológica, sendo a última característica apenas nos casos que cursaram com o envio da totalidade do tumor. Informações clínicas acerca de comorbidades, estado clínico geral e histórico médico dos animais não foram incluídas. Os dados epidemiológicos retrospectivos, foram avaliados mediante análise estatística descritiva simples.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Jaboticabal, sob protocolo nº 1678/21.

3. Resultados

Após a avaliação inicial do banco de dados, foram acessados 272 casos por busca simples, utilizando a espécie 'canino' e o diagnóstico 'carcinoma de saco anal'. Dentre os casos originalmente acessados, 12 foram excluídos por não possuírem a

confirmação do diagnóstico, obtendo-se ao final 260 casos utilizados para a avaliação retrospectiva. Os dados obtidos foram reproduzidos conforme constavam no sistema.

Inicialmente foi avaliado o perfil epidemiológico dos pacientes, referente ao sexo, idade e raça dos animais acometidos. Quanto ao sexo, foram observados 163/260 (63%) casos em fêmeas e 97/260 (37%) casos em machos.

Em relação ao fator etário foi observada média de acometimento de 11,2 anos de idade, com idade mínima registrada em 4 meses e idade máxima em 17 anos. A idade de acometimento foi dividida em grupos etários adaptados de Creevy et al. (2019), sendo considerados ‘filhotes’ os animais abaixo de 1 ano de idade; ‘jovens’ os animais com idade entre 1 e 4 anos; ‘adultos’ os animais com idade entre 5 e 10 anos; e ‘idosos’ os animais com idade acima de 10 anos. Os resultados encontrados foram descritos na tabela 1.

Tabela 1: Perfil de acometimento relatado de acordo com as faixas etárias estabelecidas. Descrição em valores absoluto e percentual.

Faixa etária	Valor absoluto	Valor percentual
Filhotes	3	1,20%
Jovens	1	0,40%
Adultos	83	31,90%
Idosos	135	51,90%
Não informado	38	14,60%

Ao avaliar o perfil racial foi observado acometimento em 24 diferentes raças, além dos animais sem raça definida (SRD). Os animais SRD foram os mais observados somando 92/260 (35,4%) casos, seguido pelas raças Poodle 42/260 (16,1%), Cocker Spaniel 27/260 (10,4%) e Dachshund 16/260 (6,1%) dos casos. As demais raças somaram menos que 5% de casos, e foram descritas na tabela 2.

Tabela 2: Perfil racial de acometimento entre caninos. Descrição em valores absoluto e percentual.

Padrão racial	Valor absoluto	Valor percentual
Sem Raça Definida (SRD)	92	35,40%
Poodle	42	16,10%
Cocker Spaniel	27	10,40%
Dachshund	16	6,10%
Maltês	9	3,50%
Labrador	8	3,10%
Pastor Alemão	8	3,10%
Pinscher	6	2,30%
Yorkshire	6	2,30%
Beagle	5	1,90%
Boxer	5	1,90%
Chow-chow	4	1,50%
Shih-tzu	4	1,50%
Basset hound	3	1,20%
Golden Retriever	3	1,20%
Schnauzer	3	1,20%
*Outros	10	3,80%
Não informado	9	3,50%

*Incluídas as raças que somaram menos que 1% de acometimento.

Adicionalmente foi avaliado o tamanho das lesões no momento do diagnóstico, apenas para os casos em que houve o envio da massa tumoral em sua totalidade, somando 178 casos. Desses, 166/178 (93%) casos apresentavam o maior diâmetro acima de 2,5cm e 12/178 (7%) casos apresentavam o maior diâmetro abaixo de 2,5cm. O ponto de corte de 2,5 cm foi determinado de acordo com o modelo de estadiamento tumoral proposto por Polton e Brearley (2007).

O caso de maior diâmetro constatado teve mensuração de 14,5cm, acometendo um cão de porte médio. Foram constatados 8/178 (4%) casos em que o maior diâmetro tumoral apresentava mensuração acima de 10cm em seu maior

diâmetro, acometendo animais de portes variados. A média observada no maior diâmetro tumoral foi de 5,4cm.

4. Discussão

Por meio da avaliação do perfil sexual foi observado no presente estudo uma maior prevalência de fêmeas, acima de 60% dos casos, em concordância com Williams et al. (2003), Polton et al. (2007) e Meier et al. (2017). No entanto, esse achado é discordante com diversos outros estudos que destacaram um maior acometimento em machos (Turek et al., 2003; Williams et al., 2003; Polton et al., 2006; Polton e Brearley, 2007; Knudsen et al., 2013; Potanas et al., 2015; Pradel et al., 2018; Elliott, 2019). Sugere-se ainda uma possível predisposição em machos castrados (Turek et al., 2003; Urie et al., 2012; Knudsen et al., 2013; Palladino et al., 2016; Wouda et al., 2016; Barnes e Demetriou, 2017; McQuown et al., 2017; Elliott, 2019; Pradel et al., 2018; Skorupski et al., 2018; Heaton et al., 2020; Schlag et al., 2020), entretanto o status reprodutivo não foi avaliado no trabalho. Os achados acerca de predisposição sexual são conflitantes.

O perfil etário evidenciou um maior acometimento em animais acima de 10 anos idade, seguido por aqueles entre 5 a 10 anos, demonstrando maior incidência em animais considerados adultos e idosos, sendo consideradas as faixas etárias mais acometidas (Daleck e Nardi, 2016; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020). A média de idade de acometimento, observada em 11,2 anos permaneceu dentro do intervalo descrito em diferentes trabalhos que variaram de 9 anos até 11,5 anos (Potanas et al., 2015; Barnes e Demetriou, 2017; McQuown et al., 2017; Meier et al., 2017; Pradel et al., 2018; Chambers et al., 2020; Heaton et al., 2020; Schlag et al., 2020)

Quanto ao perfil racial, os animais sem raça definida foram descritos como grupo mais acometido, fato observado em estudos brasileiros e relacionado a padrões socioculturais do país, e não necessariamente à predisposição genética. A raça Poodle, descrita com a maior incidência dentre os animais de raça definida no presente trabalho, não é comumente descrita com incidência significativa, figurando dentre as raças mais presentes apenas no estudo realizado por Heaton et al. (2020) e ocorrendo com incidência baixa em estudos realizados por Bennett et al. (2002) e

Wouda et al. (2016). A elevada incidência observada na raça Poodle pode estar relacionada a popularidade da raça em território brasileiro, e não necessariamente a predisposição genética.

As raças Cocker Spaniel e Dachshund apareceram respectivamente como segunda e terceira raças de maior incidência observadas no estudo, sendo raças com predisposição já descrita em literatura (Turek et al., 2003; Polton et al., 2006; Polton e Brearley, 2007; Polton et al., 2007; Barnes e Demetriou, 2017; Pradel et al., 2018; Elliott, 2019; Chambers et al., 2020).

O tamanho tumoral foi avaliado mediante mensuração do maior diâmetro tumoral com resultado médio de 5,4 cm, com apenas 7% de casos com maior diâmetro abaixo de 2,5 cm, considerados T1 de acordo com modelo de estadiamento do carcinoma de saco anal proposto por Polton e Brearley (2007). Em contrapartida, estudos realizados por Turek et al. (2003), Pradel et al. (2018), Skorupski et al. (2018), Chambers et al. (2020) e Schlag et al. (2020) registraram média tumoral abaixo de 2,5 cm, e Heaton et al. (2020) média tumoral de 3,0 cm, também considerada baixa.

Foram constatados ainda 4% de casos em que o maior diâmetro tumoral apresentou dimensões superiores a 10 cm, fato não observado em estudos semelhantes, onde nenhum caso foi registrado nessas dimensões (Turek et al., 2003; Polton e Brearley, 2007; Polton et al., 2007; Urie et al., 2012; Pradel et al., 2018; Skorupski et al., 2018; Chambers et al., 2020; Heaton et al., 2020; Schlag et al., 2020). O estudo realizado por Meier et al. (2017) evidenciou um caso com mensuração tumoral com maior diâmetro de 12 cm, ainda abaixo do maior diâmetro de 14,5 cm observado neste estudo. Os achados demonstram o diagnóstico frequentemente tardio relacionado a esse tipo neoplásico, observado pelas dimensões tumorais com tendências a tamanhos elevados na maior parte dos casos.

5. Conclusão

O estudo ilustrou o perfil dos animais mais acometidos pelo carcinoma de saco anal, concentrado em fêmeas, sem raça definida e de idade avançada, achado que não se mostrou totalmente concordante com dados de literatura, evidenciando que as

questões socioculturais do país podem influenciar na incidência desse tipo neoplásico. Os achados referentes ao tamanho tumoral reforçam a necessidade de uma maior atenção a avaliação da palpação retal, especialmente nos animais geriátricos, permitindo alcançar o diagnóstico da neoplasia de forma precoce.

6. Referências

Barnes DC, Demetriou JL (2017) Surgical management of primary, metastatic and recurrent anal sac adenocarcinoma in the dog: 52 cases. **Journal of Small Animal Practice** 58(5): 263-268.

Bennett PF, DeNicola DB, Patty Bonney P, Glickman NW, Knapp DW (2002) Canine anal sac adenocarcinomas: clinical presentation and response to therapy. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 16(1): 100-104.

Chambers AR, Skinner OT, Mickelson MA, Schlag AN, Butler JR, Wallace ML, Moyer AL, Vinayak A, Samuel N, Kennedy KC, Oakes KE, Scharf VF, Parker LA, Wustefeld-Janssens BG (2020) Adherence to follow-up recommendations for dogs with apocrine gland anal sac adenocarcinoma: A multicentre retrospective study. **Veterinary and Comparative Oncology** 18(4): 683-688.

Creevy KE, Grady J, Little SE, Moore GE, Strickler BG, Thompson S, Webb JA (2019) 2019 AAHA canine life stage guidelines. **Journal of the American Animal Hospital Association** 55(6):267-290.

Daleck CR, Nardi AB (2ª ed.) (2016) Oncologia em Cães e Gatos. São Paulo: Roca; 1075p.

Elliott JW (2019) Response and outcome following toceranib phosphate treatment for stage four anal sac apocrine gland adenocarcinoma in dogs: 15 cases (2013–2017). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 254(8): 960-966.

Heaton CM, Fernandes AF, Jark PC, Pan X (2020). Evaluation of toceranib for treatment of apocrine gland anal sac adenocarcinoma in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 34(2): 873-881.

Knudsen CS, Williams A, Brearley MJ, Demetriou JL (2013) COX-2 expression in canine anal sac adenocarcinomas and in non-neoplastic canine anal sacs. **The Veterinary Journal** 197(3): 782-787.

McQuown B, Keyerleber MA, Rosen K, McEntee MC, Burgess KE (2017) Treatment of advanced canine anal sac adenocarcinoma with hypofractionated radiation therapy: 77 cases (1999–2013). **Veterinary and Comparative Oncology** 15(3): 840-851.

Meier V, Polton G, Cancedda S, Roos M, Laganga P, Emmerson T, Bley CR (2017) Outcome in dogs with advanced (stage 3b) anal sac gland carcinoma treated with surgery or hypofractionated radiation therapy. **Veterinary and Comparative Oncology** 15(3): 1073-1086.

Meuten DJ (5^a ed.) (2017) Tumors in domestic animals. Ames: John Wiley & Sons Inc, 989p.

Palladino S, Keyerleber MA, King RG, Burgess KE (2016) Utility of computed tomography versus abdominal ultrasound examination to identify iliosacral lymphadenomegaly in dogs with apocrine gland adenocarcinoma of the anal sac. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 30(6): 1858-1863.

Polton GA, Mowat V, Lee HC, Mckee KA, Scase TJ (2006) Breed, gender and neutering status of British dogs with anal sac gland carcinoma. **Veterinary and Comparative Oncology** 4(3): 125-131.

Polton GA, Brearley MJ (2007) Clinical stage, therapy, and prognosis in canine anal sac gland carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 21(2): 274-280.

Polton GA, Brearley MJ, Green LM, Scase TJ (2007) Expression of E-cadherin in canine anal sac gland carcinoma and its association with survival. **Veterinary and Comparative Oncology** 5(4): 232-238.

Potanas CP, Padgett S, Gamblin RM (2015) Surgical excision of anal sac apocrine gland adenocarcinomas with and without adjunctive chemotherapy in dogs: 42 cases (2005–2011). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 246(8): 877-884.

Pradel J, Berlato D, Dobromylskyj M, Rasotto R (2018) Prognostic significance of histopathology in canine anal sac gland adenocarcinomas: preliminary results in a retrospective study of 39 cases. **Veterinary and Comparative Oncology** 16(4): 518-528.

Schlag AN, Johnson T, Vinayak A, Kuvaldina A, Skinner OT, Wustefeld-Janssens BG (2020) Comparison of methods to determine primary tumour size in canine apocrine gland anal sac adenocarcinoma. **Journal of Small Animal Practice** 61(3): 185-189.

Skorupski KA, Alarcón CN, Lorimier, LP, LaDouceur EEB, Rodriguez CO, Rebhun RB (2018) Outcome and clinical, pathological, and immunohistochemical factors associated with prognosis for dogs with early-stage anal sac adenocarcinoma treated with surgery alone: 34 cases (2002–2013). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 253(1): 84-91.

Turek MM, Forrest LJ, Adams WM, Helfand SC, Vail DM (2003) Postoperative radiotherapy and mitoxantrone for anal sac adenocarcinoma in the dog: 15 cases (1991–2001). **Veterinary and Comparative Oncology** 1(2): 94-104.

Urie BK, Russell DS, Kisseberth WC, London CA (2012) Evaluation of expression and function of vascular endothelial growth factor receptor 2, platelet derived growth factor receptors- α and - β , KIT, and RET in canine apocrine gland anal sac adenocarcinoma and thyroid carcinoma. **Veterinary Research** 8(67): 2-9.

Williams LE, Gliatto JM, Dodge RK, Johnson JL, Gamblin RM, Thamm DH, Lana SE, Szymkowski M, Moore AS (2003) Carcinoma of the apocrine glands of the anal sac in dogs: 113 cases (1985–1995). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 223(6): 825-831.

Withrow SJ, Vail DM, Page RL (6^a ed.) (2020) Small Animal Clinical Oncology. St. Louis: Elsevier, 842p.

Wouda RM, Borrego J, Keuler NS, Stein T (2016) Evaluation of adjuvant carboplatin chemotherapy in the management of surgically excised anal sac apocrine gland adenocarcinoma in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology** 14(1): 67-80.

CAPÍTULO 3 – Avaliação imunoistoquímica do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e do antígeno nuclear Ki67 no carcinoma de saco anal canino

Resumo: O carcinoma de saco anal é uma neoplasia marcada por comportamento agressivo, com diversas formas de terapia relatadas. A cirurgia permanece como tratamento de eleição, sendo, no entanto, controversa em casos avançados e com metástase instalada. Os fatores prognósticos conhecidos, são igualmente controversos, e dessa forma, novos estudos têm sido realizados buscando novos marcadores prognósticos e preditivos. O HER2 é uma proteína de membrana relacionada ao processo de tumorigênese, expressa em diferentes tipos tumorais. O Ki67, por sua vez, é uma proteína nuclear, com função relacionada à proliferação celular que atua, como importante marcador prognóstico no câncer. Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a imunoexpressão dos marcadores HER2 e Ki67 em casos de carcinoma de saco anal canino. Foram obtidas amostras de carcinoma de saco anal, incluídas em parafina, junto ao laboratório parceiro, divididas em quatro grupos: maior diâmetro tumoral menor que 2,5cm, maior diâmetro tumoral maior que 2,5cm, linfonodos metastáticos e grupo controle. Cada grupo foi representado por um N de 10 amostras, sendo então realizada imunomarcação para os marcadores HER2 e Ki67. Observou-se marcação de HER2 positiva em 45% dos casos de tumor primário, com marcação 100% negativa no grupo controle, composto por amostras de saco anal íntegro. A imunoexpressão do Ki67 teve mediana de 25% em todos os grupos avaliados, com exceção do grupo controle, com mediana de 8% de imunoexpressão. Não houve associação entre a imunoexpressão do HER2 ou do Ki67 nos diferentes tamanhos tumorais, nem na comparação de tumores primários e metastáticos. O estudo demonstrou que a imunoexpressão do HER2 e do Ki67 está presente em carcinomas de saco anal, representando um potencial alvo terapêutico, diferindo dos sacos anais não neoplásicos.

Palavras-Chave: adenocarcinoma apócrino do saco anal, imunoistoquímica, neoplasia.

1. Introdução

O carcinoma de saco anal tem origem nas glândulas apócrinas localizadas no interior dos sacos anais, e possui incidência significativa correspondendo a 17% dos tumores na região perianal, e 2% de todas as neoplasias cutâneas na espécie canina (Meuten, 2017; Withrow et al., 2020). Seu desenvolvimento é inicialmente discreto, com massas intradérmicas e subcutâneas perceptíveis somente à palpação retal, com os casos mais avançados formando massas externas de grandes dimensões e aspectos variados (Williams et al., 2003; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020). Em relação ao comportamento, a neoplasia apresenta agressividade local variável, porém, com elevado potencial metastático, com cerca de 26% a 96% dos casos cursando com metástase local, e 0 a 42% dos casos com metástase à distância, desde o momento do diagnóstico inicial (Bennett et al., 2002; Williams et al., 2003; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020).

O tratamento de eleição consiste na excisão cirúrgica, considerada eficaz em tumores de dimensões inferiores, porém complexa em casos avançados. Modalidades adjuvantes podem ser associadas, incluindo a quimioterapia, radioterapia, eletroquimioterapia, terapia alvo molecular e inibidores de ciclooxigenase-2, entretanto a real eficácia dessas modalidades ainda necessita de maior comprovação (Potanas et al., 2015; Barnes et al., 2017; Chambers et al., 2020; Heaton et al., 2020; Withrow et al., 2020). Fatores prognósticos descritos incluem o estadiamento clínico, diâmetro tumoral, presença de metástases regionais e a distância, presença de hipercalcemia paraneoplásica e características histológicas do tumor (Wouda et al., 2016; Meuten, 2017; Pradel et al., 2018; Withrow et al., 2020). O prognóstico varia de reservado a desfavorável, com tempo de sobrevida extremamente variável, entre 0 e 1873 dias (Williams et al., 2003; Meuten, 2017; Withrow et al., 2020). Nesse contexto, a validação de novos marcadores preditivos e prognósticos se torna essencial.

O HER2 é uma proteína de membrana pertencente à família do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR/HER), de expressão normal nos tecidos orgânicos, e função relacionada ao crescimento e diferenciação celular. Quando superexpresso, o receptor HER2 desencadeia estímulos proliferativos e desregulação dos mecanismos de controle celular, promovendo a tumorigênese (Yarden, 2001;

Krishnamurti e Silverman, 2014; Yan et al., 2015; Hsu e Hung, 2016; Majumder et al., 2021).

Os receptores HER2 tem o seu aumento comprovado em diversos tipos neoplásicos na medicina humana e veterinária (Yarden, 2001; Flint et al., 2004; Ressel et al., 2013; Terragni et al., 2014; Yan et al., 2015; Hsu e Hung, 2016; Lorch et al., 2019; Tsuboi et al., 2019; Yoshimoto et al., 2019a; Yoshimoto et al., 2019b; Yoshimoto et al., 2020; Majumder et al., 2021). Seu potencial como alvo terapêutico tem sido explorado através dos anticorpos monoclonais anti-HER2 que atuam reconhecendo e bloqueando o domínio extracelular do receptor (Yarden, 2001; Sakai et al., 2018; García et al., 2020; Tanaka et al., 2020; Maeda et al., 2022)

A proteína Ki67, por sua vez, é uma proteína nuclear, que tem sua função relacionada à proliferação celular, com presença marcada em células ativas no ciclo celular e mínima ou ausente em células em quiescência (Tao Li et al., 2015; Miller et al., 2018). Sua expressão é observada em todas as células em proliferação, normais ou neoplásicas, associada à meia-vida curta, de aproximadamente 1 hora, regulada por um equilibrado mecanismo de síntese e degradação proteica (Tao Li et al., 2015; Meuten, 2017; Sun e Kaufman, 2018).

Devido as suas características metabólicas e funcionais, a proteína Ki67 é utilizada como um dos principais marcadores relacionados a proliferação celular, amplamente utilizada na oncologia humana e veterinária (Meuten, 2017; Gil e Vagnarelli, 2018). Sua aplicação como marcador prognóstico de índice proliferativo é descrita em diferentes tipos tumorais nos cães (Meuten, 2017; Withrow et al., 2020).

O presente trabalho, tem o objetivo de avaliar a imunoexpressão do marcador HER2 e do marcador Ki67 em casos de carcinoma de saco anal canino, associando ambos ao tamanho tumoral e a imunoexpressão em linfonodos metastáticos.

2. Material e métodos

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Jaboticabal, sob protocolo nº 1678/21.

Foram selecionados um total de 20 casos de carcinoma de saco anal canino, com confirmação histopatológica (figura 1) provenientes de laboratório parceiro. Destes, 10 casos apresentavam o maior diâmetro tumoral menor que 2,5 cm, configurando o grupo T1; e 10 apresentavam o maior diâmetro tumoral maior que 2,5 cm, configurando o grupo T2. O ponto de corte de 2,5 cm foi determinado de acordo com o modelo de estadiamento tumoral proposto por Polton e Brearley (2007). A mensuração do tamanho tumoral foi realizada na peça cirúrgica, no momento de entrada da amostra no laboratório.

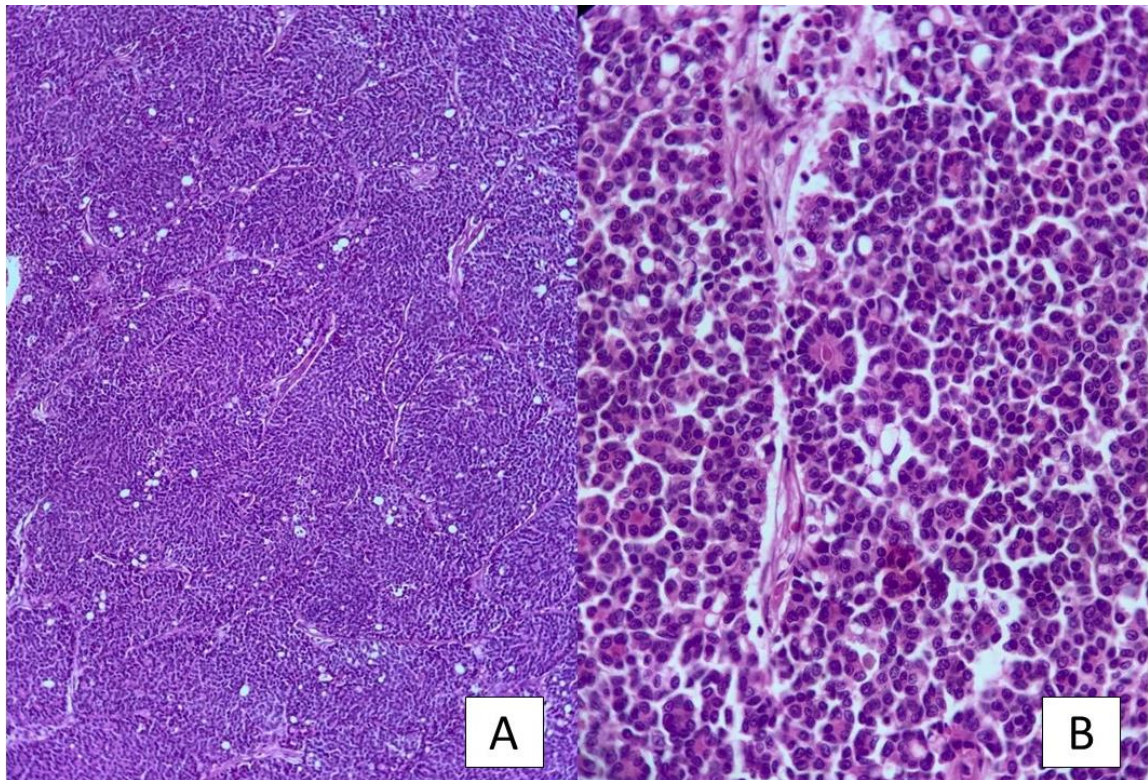


Figura 1: Fotomicrografias de carcinoma de saco anal em exame histopatológico. Hematoxilina e eosina (HE). A: Aumento de 10x. B: Aumento de 40x.

Dentre os 20 casos inicialmente selecionados, 10 cursavam com o envio de amostras de linfonodos metastáticos, que também foram selecionados, configurando o grupo linfonodos metastáticos (LM). Somado a isso, foram coletadas 10 amostras de saco anal íntegro de caninos, provenientes de hospital veterinário parceiro, após autorização prévia dos responsáveis, com óbito não relacionado a afecção neoplásica, configurando o grupo controle (GC).

Do total selecionado de 30 casos, somando 40 amostras, foram obtidos os blocos de parafina, posteriormente submetidos a avaliação imunoistoquímica para verificação da imunoexpressão dos marcadores HER2 e Ki67.

As reações de imunoistoquímica foram realizadas no laboratório parceiro, seguindo o protocolo padrão já estabelecido pelo mesmo para o tecido e espécie. Para a realização da técnica os fragmentos previamente incluídos em blocos de parafina foram cortados na espessura de 4 μ m, dispostos em lâminas para microscopia previamente sinalizadas posteriormente desparafinados, reidratados e lavados com solução tampão PBS.

Foi então realizado o bloqueio da peroxidase endógena, seguido por lavagem com solução tampão PBS e recuperação antigênica por calor úmido, em solução de EDTA pH 8,9 em panela de pressão Pascal-Dako. Ao final, as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente e lavadas com solução tampão TBS.

A seguir, o anticorpo primário foi aplicado, de forma a cobrir todo o fragmento, e as lâminas foram transferidas para estufa em 37°C por 40 minutos e depois para geladeira a 4°C durante 16h (overnight). Posteriormente as lâminas foram lavadas com a solução tampão PBS, o anticorpo secundário foi aplicado e as lâminas foram transferidas para estufa em 37°C por 35 minutos. As lâminas foram então lavadas com solução tampão PBS, e o cromógeno 3,3'-diaminobendizidina (DAB) foi aplicado e mantido nos cortes por até cinco minutos.

Por fim, foi realizada a contra coloração com Hematoxilina de Harris, seguida de uma passagem em amônia e lavagem da lâmina em água corrente. As lâminas foram então diafanizadas e montadas. A avaliação dos resultados da imunoistoquímica foi realizada sob microscopia óptica de luz, na objetiva de 40x.

Os anticorpos específicos utilizados foram o anticorpo mouse monoclonal anti-HER-2 (Dako cytomation, Carpinteria, CA, USA), na diluição de 1:50; e o anticorpo primário anti-Ki-67 (MIB-1 Novocastra), na diluição de 1:100. Controle positivo e negativo.

A avaliação da imunoexpressão do HER2 foi realizada mediante sistema de escores, baseados nas diretrizes propostas pela American Society of Clinical

Oncology (ASCO) e pelo College of American Pathologists Clinical (CAP) (Perez et al., 2014; Wolff et al., 2014) conforme tabela 1. Para fins de padronização, foram consideradas positivas as amostras com escore 2+ ou 3+ e negativas as amostras com escore 0 ou 1+. A figura 1 ilustra as marcações 3+, 2+ e 1+.

Tabela 1: Modelo de classificação da imunoexpressão do HER2 em escores proposto pela ASCO/CAP.

Escore	Descrição
3 +	Marcação circunferencial em membrana, que seja completa, intensa, com presença > 10% das células tumorais.
2 +	Marcação circunferencial em membrana, que seja incompleta e/ou fraca/moderada, com presença > 10% das células tumorais; ou marcação circunferencial em membrana, que seja completa, intensa, com presença ≤ 10% das células tumorais.
1 +	Marcação em membrana que seja incompleta, muito fraca/quase imperceptível, com presença > 10% das células tumorais.
0	Sem marcação observada; ou marcação em membrana que seja incompleta, muito fraca/quase imperceptível, com presença ≤ 10% das células tumorais.

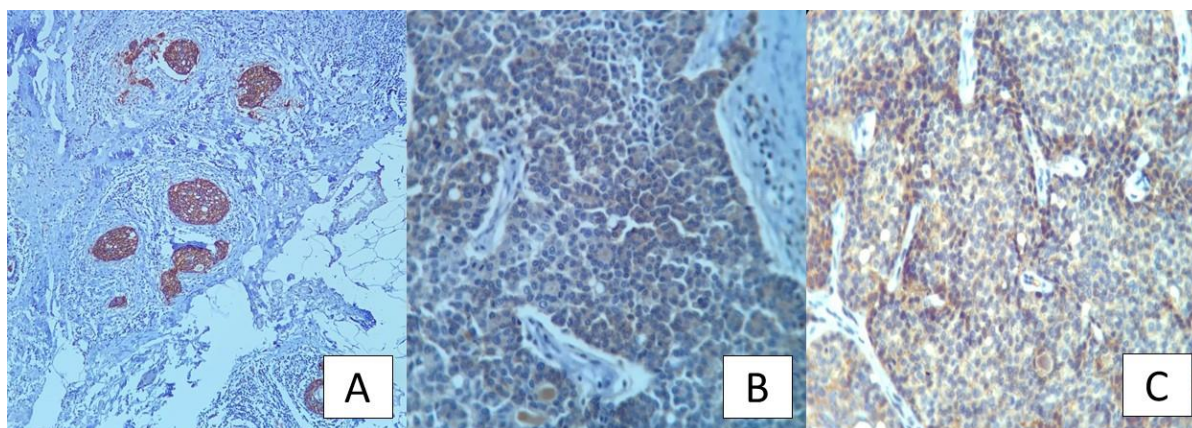


Figura 2: Fotomicrografias de imunomarcção do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). A: controle positivo representando escore 3+. Aumento de 10x. B: imunomarcção em carcinoma de saco anal representando escore 2+. Aumento de 40x. C: imunomarcção em carcinoma de saco anal representando escore 2+. Aumento de 40x.

A avaliação da imunoexpressão do Ki67 foi determinada pela porcentagem de núcleos positivos em pelo menos 500 células neoplásicas, avaliadas em 5 hot-spots (campos com maior quantidade de núcleos marcados). Cada núcleo que apresentou evidência de imunoexpressão foi considerado positivo para expressão de Ki67.

A análise estatística foi realizada utilizando pacote estatístico IBM SPSS Statistics 25 (IBM®, NY, Estados Unidos) e para todos os testes realizados utilizou-se intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0.05$). Foi realizado teste exato de Fisher para verificar se havia diferença na marcação de HER 2 dos tumores e linfonodos conforme os diferentes tamanhos, assim como realizou-se teste Qui-quadrado para verificar a associação referente ao Ki67. Ainda foi realizado teste de kappa para verificar se havia concordância entre as marcações de HER 2 e Ki67 dos tumores e seus respectivos linfonodos.

3. Resultados

Com relação a análise da imunoexpressão do marcador HER2, nas amostras de tumor primário de saco anal foi observada marcação positiva em 45% dos casos e marcação negativa em 55% dos casos. As marcações observadas em cada grupo foram expressas na tabela 2.

Tabela 2: Imunoexpressão do HER2 descrita em escores de acordo com os grupos estabelecidos.

GRUPO \ ESCORE	Escore 0	Escore 1+	Escore 2+	Escore 3+
	Marcação Negativa		Marcação Positiva	
GC (N=10)	10/10 (100%)	0	0	0
T1 (N=10)	1/10 (10%)	5/10 (50%)	4/10 (40%)	0
T2 (N=10)	0	5/10 (50%)	5/10 (50%)	0
LM (N=10)	0	6/10 (60%)	4/10 (40%)	0

Legenda: GC (grupo controle), T1 (Maior diâmetro tumoral menor que 2,5cm), T2 (Maior diâmetro tumoral maior que 2,5cm) e LM (grupo linfonodo metastático).

Quanto a análise da imunoexpressão do marcador Ki67 foi observado no grupo T1 mediana de 25%, média de 25% e variação de 15% a 40%; no grupo T2 mediana de 25%, média de 28% e variação de 15% a 40%; no grupo LM mediana de 25%, média de 26% e variação de 20% a 40%. No grupo GC foi observada mediana de 8%, média de 8% e variação de 5% a 10%. Os valores exatos observados em cada grupo foram descritos na tabela 3.

Tabela 3: Imunoexpressão de Ki67 descrita em valores percentuais de acordo com os grupos estabelecidos.

GRUPO \ ESCORE	ESCORE							
	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%
GC (N=10)	5/10 (50%)	5/10 (50%)	0	0	0	0	0	0
T1 (N=10)	0	0	2/10 (20%)	1/10 (10%)	5/10 (50%)	1/10 (10%)	0	1/10 (10%)
T2 (N=10)	0	0	1/10 (10%)	3/10 (30%)	2/10 (20%)	1/10 (10%)	0	3/10 (30%)
LM (N=10)	0	0	0	3/10 (30%)	4/10 (40%)	2/10 (20%)	0	1/10 (10%)

Legenda: GC (grupo controle), T1 (Maior diâmetro tumoral menor que 2,5cm), T2 (Maior diâmetro tumoral maior que 2,5cm e LM (grupo linfonodo metastático).

Utilizando o teste Qui-quadrado para verificar a diferença de marcação de HER2 entre os grupos GC, T1 e T2, considerou-se o teste como significativo, uma vez que GC diferiu dos demais grupos ($P = 0,036$) apesar de não haver diferença entre os grupos T1 e T2 ($P=0,500$). Utilizando o mesmo teste para verificar a existência de associação entre a marcação de Ki67 e os grupos GC, T1 e T2, não houve diferença entre os grupos ($P = 0,460$).

Na análise realizada utilizando o teste de kappa para verificar a concordância de imunoexpressão do HER2 entre as amostras de tumor primário e seus respectivos linfonodos metastáticos, observou-se concordância fraca ($K = 0,400$), e o teste não foi válido ($P = 0,197$). Utilizando a mesma análise para o marcador Ki67, observou-se concordância fraca ($K = 0,333$), porém o teste foi válido ($P = 0,05$), havendo concordância de 33,3%.

4. Discussão

Diversos estudos investigaram o tamanho tumoral como fator prognóstico nos casos de carcinoma de saco anal, porém relacionados a diferentes valores de corte (Williams et al., 2003; Skorupski et al., 2018; Schlag et al., 2020). O uso do tamanho sugerido por Polton e Brearley (2007), em seu modelo de estadiamento é o mais aceito. Nesse estudo a sua mensuração foi realizada mediante avaliação clínica com paquímetro, diferentemente do presente estudo, em que a mensuração do tamanho tumoral foi realizada diretamente no tecido fixado em formalina. Entretanto a concordância entre os diferentes métodos de mensuração já foi avaliada, evidenciando concordância moderada entre os métodos de avaliação retal da massa tumoral e avaliação em tecido fixado em formalina (Schlag et al., 2020).

A imunoexpressão do HER2 já foi investigada na medicina veterinária, em diferentes tipos tumorais. Tsuboi et al. (2019) avaliaram a imunoexpressão relacionada aos carcinomas uroteliais em bexiga, tendo observado marcação positiva em 60,9% dos casos de carcinoma, 37,5% dos casos de cistite polipoide e 0% em tecido normal da bexiga. Yoshimoto et al. (2019a) avaliaram a imunoexpressão relacionada a casos de carcinoma de tireoide, com marcação positiva em 48% dos casos; e em um estudo diferente Yoshimoto et al. (2020) avaliaram a imunoexpressão em casos de tumores pulmonares primários, com marcação positiva em 69% dos casos. Sakai et al. (2021) avaliaram a imunoexpressão no carcinoma prostático e observaram marcação 100% negativa no tecido prostático normal, e marcação positiva em 61,5% dos casos de carcinoma prostático. Brunetti et al. (2021) realizaram um estudo mais amplo, avaliando carcinomas de diferentes origens, incluindo carcinomas de células escamosas cutâneo e oral, carcinoma gastrointestinal, carcinoma retal, carcinoma pulmonar, carcinoma urotelial, carcinoma prostático e carcinoma ovariano, observando assim uma maior imunoexpressão principalmente nos carcinomas de origem no trato intestinal, porém com marcação presente também em todos os demais tipos, avaliados. O recente interesse em identificar a imunoexpressão do HER2 em tumores caninos está relacionado ao seu potencial como alvo terapêutico, com os avanços em terapia alvo molecular direcionada aos receptores HER2, por meio de inibidores do receptor (Sakai et al., 2018; García et al., 2020; Tanaka et al., 2020; Maeda et al., 2022).

A imunoexpressão do HER2 em carcinomas de saco anal já foi previamente descrita por Yoshimoto et al. (2019b) que avaliou 25 casos de carcinoma de saco anal mediante exame de imunoistoquímica, de forma semelhante ao presente estudo, com marcação positiva em 80% dos casos e predomínio de casos de escore 2+ (56%) frente a um menor número de casos de escore 3+ (24%). No presente trabalho, ao avaliar a imunoexpressão nas amostras provenientes do tumor primário, somando T1 e T2, se observou marcação positiva em 45% dos casos, representado apenas por casos de escore 2+, não sendo observado nenhum caso de escore 3+. Apesar da marcação numericamente inferior, não pode ser descartado o papel do HER2 nesse tipo neoplásico, principalmente considerando a significância estatística, comprovada mediante teste qui-quadrado, em relação a ausência de marcação nas amostras de saco anal íntegro.

A avaliação da associação entre a imunoexpressão do marcador HER2 e o tamanho tumoral foi negativa nos testes estatísticos realizados, sem diferença entre os grupos T1 e T2. Esse achado comprova que a imunoexpressão do marcador está presente mesmo em tumores de dimensões inferiores, diagnosticados em estágios iniciais, demonstrando que mesmo esses casos podem se beneficiar de terapias alvo.

No presente estudo observou-se também a imunoexpressão do HER2 nas amostras de linfonodo metastático, não sendo observada diferença estatística de imunoexpressão em relação aos tumores primários, não sendo possível realizar afirmações acerca do seu valor como marcador prognóstico. Estudos anteriores não avaliaram a imunoexpressão em amostras de linfonodos metastáticos, entretanto, ao buscar correlações entre o marcador e os fatores clínicos prognósticos, não houve correção aparente (Tsuboi et al., 2019; Yoshimoto et al., 2019a; Yoshimoto et al., 2019b; Yoshimoto et al., 2020; Sakai et al., 2021).

Em relação a proteína Ki67, seu papel prognóstico na avaliação de diferentes tipos tumorais (Meuten, 2017; Withrow et al., 2020), e a sua marcação positiva nos carcinomas de saco anal já fora previamente comprovada (Pereira et al., 2013; Suzuki et al., 2013). Entretanto, sua imunoexpressão, em avaliação quantitativa, evidencia resultados variados. No presente estudo os valores de mediana, média e variação, observados nos grupos T1, T2 e LM, foram semelhantes aos valores descritos por

Skorupski et al. (2018) que observou mediana de 25%, média de 26% e variação de 13% a 48%. Outros estudos evidenciaram valores superiores, com mediana de 34,33%, média de 34,58% e variação de 19,6% a 55,98% (Morello et al., 2021) ou inferiores com mediana de 7,75% e variação de 0% a 54% (Wong et al., 2021). Perante aos achados conflitantes, não foi possível avaliar o valor prognóstico ou sugerir um valor de corte associado a imunoexpressão desse marcador, sendo necessários novos estudos com essa finalidade.

A concordância da imunoexpressão entre tumor primário e linfonodo metastático, bem como a associação ao tamanho tumoral, não foram comprovadas estatisticamente no estudo. A associação da marcação do Ki67 a outros fatores clínicos não pode ser comprovada em estudos semelhantes (Skorupski et al., 2018; Morello et al., 2021; Wong et al., 2021).

5. Conclusão

A imunoexpressão do HER2 se mostrou presente nos carcinomas de saco anal, mesmo naqueles de dimensões mínimas, menores que 2,5 cm em seu maior diâmetro, bem como em linfonodos regionais com metástase instalada. A marcação observada, em 45% dos casos, é inferior ao demonstrado em outros estudos, entretanto, quando comparada a marcação em sacos anais íntegros, de 0% dos casos, evidencia a sua importância no processo neoplásico. Conclui-se ainda que os carcinomas de saco anal, comprovadamente expressam a proteína Ki67, entretanto não foi possível sugerir um valor de corte, nem determinar o seu valor prognóstico. Ambos os marcadores apresentam imunoexpressão clara e representam potenciais alvos terapêuticos para novas drogas em desenvolvimento, porém, novos estudos são necessários para validar o seu valor prognóstico.

6. Referências

Barnes DC, Demetriou JL (2017) Surgical management of primary, metastatic and recurrent anal sac adenocarcinoma in the dog: 52 cases. **Journal of Small Animal Practice** 58(5): 263-268.

Bennett PF, DeNicola DB, Patty Bonney P, Glickman NW, Knapp DW (2002) Canine anal sac adenocarcinomas: clinical presentation and response to therapy. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 16(1): 100-104.

Brunetti B, Bacci B, Sarli G, Pancioni E, Muscatello LV (2021) Immunohistochemical Screening of HER2 in Canine Carcinomas: A Preliminary Study. **Animals** 11(4): 1006.

Chambers AR, Skinner OT, Mickelson MA, Schlag AN, Butler JR, Wallace ML, Moyer AL, Vinayak A, Samuel N, Kennedy KC, Oakes KE, Scharf VF, Parker LA, Wustefeld-Janssens BG (2020) Adherence to follow-up recommendations for dogs with apocrine gland anal sac adenocarcinoma: A multicentre retrospective study. **Veterinary and Comparative Oncology** 18(4): 683-688.

Flint AF, U'ren, L, Legare ME, Withrow SJ, Dernell W, Hanneman WH (2004) Overexpression of the erbB-2 proto-oncogene in canine osteosarcoma cell lines and tumors. **Veterinary Pathology** 41(3): 291-296.

García JMC, Murillo CEG, Jaramillo MR (2020). EGFR and HER2 small molecules inhibitors as potential therapeutics in veterinary oncology. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas** 49(2): 452-471.

Gil RS, Vagnarelli P (2018) Ki-67: More Hidden behind a 'Classic Proliferation Marker'. **Trends in Biochemical Sciences** 43(10): 747-748.

Heaton CM, Fernandes AF, Jark PC, Pan X (2020). Evaluation of toceranib for treatment of apocrine gland anal sac adenocarcinoma in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 34(2): 873-881.

Hsu JL, Hung MC (2016) The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cancer. **Cancer and Metastasis Reviews** 35(4): 575-588.

Krishnamurti U, Silverman JF (2014) HER2 in breast cancer: a review and update. **Advances in Anatomic Pathology** 21(2): 100-107.

Lorch G, Sivaprakasam K, Zismann V, Perdignes N, Contente-Cuomo T, Nazareno A, Facista S, Wong S, Drenner K, Liang WS, Amann JM, Sinicropi-Yao SL, Koenig MJ, La Perle K, Whitsett TG, Murtaza M, Trent JM, Carbone DP, Hendricks WPD (2019)

Identification of recurrent activating HER2 mutations in primary canine pulmonary adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research** 25(19): 5866-5877.

Maeda S, Sakai K, Kaji K, Iio A, Nakazawa M, Motegi T, Yonezawa T, Momoi Y (2022) Lapatinib as first-line treatment for muscle-invasive urothelial carcinoma in dogs. **Scientific Reports** 12(1):1-10.

Majumder A, Sandhu M, Banerji D, Steri V, Olshen A, Moasser MM (2021) The role of HER2 and HER3 in HER2-amplified cancers beyond breast cancers. **Scientific Reports** 11(1): 1-11.

Meuten DJ (5^a ed.) (2017) Tumors in domestic animals. Ames: John Wiley & Sons Inc, 989p.

Miller, I Min M, Yang C, Tian C, Gookin S, Carter D, Spencer SL (2018) Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence. **Cell Reports** 24(5): 1105-1112.

Morello EM, Cino M, Giacobino D, Nicoletti A, Iussich S, Buracco P, Martano M (2021) Prognostic Value of Ki67 and Other Clinical and Histopathological Factors in Canine Apocrine Gland Anal Sac Adenocarcinoma. **Animals** 11(6): 1649.

Pereira RS, Schweigert A, Melo GD, Fernandes FV, Sueiro FAR, Machado GF (2013) Ki-67 labeling in canine perianal glands neoplasms: a novel approach for immunohistological diagnostic and prognostic. **BMC Veterinary Research** 9(1): 1-7.

Perez EA, Cortés J, Gonzalez-Ângulo AM, Bartlett JMS (2014) HER2 testing: Current status and future directions. **Cancer Treatment Reviews** 40(2014): 276-284.

Polton GA, Brearley MJ (2007) Clinical stage, therapy, and prognosis in canine anal sac gland carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 21(2): 274-280.

Potanas CP, Padgett S, Gamblin RM (2015) Surgical excision of anal sac apocrine gland adenocarcinomas with and without adjunctive chemotherapy in dogs: 42 cases (2005–2011). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 246(8): 877-884.

Pradel J, Berlato D, Dobromylskyj M, Rasotto R (2018) Prognostic significance of histopathology in canine anal sac gland adenocarcinomas: preliminary results in a retrospective study of 39 cases. **Veterinary and Comparative Oncology** 16(4): 518-528.

Ressel L, Puleio R, Loria GR, Vannozzi I, Millanta F, Caracappa S, Poli A (2013) HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. **Research in Veterinary Science** 94(2): 299-305.

Sakai K, Maeda S, Saeki K, Nakagawa T, Murakami M, Endo Y, Yonezawa T, Kadosawa T, Mori T, Nishimura R, Matsuki N (2018) Anti-tumour effect of lapatinib in canine transitional cell carcinoma cell lines. **Veterinary and Comparative Oncology** 16(4): 642-649.

Sakai K, Shinohara Y, Kaji K, Yonezawa T, MoMoi Y, Maeda S (2021) Human epidermal growth factor receptor 2 is overexpressed in canine prostate carcinoma. **Translational and Regulatory Sciences** 3(1):1-8.

Schlag AN, Johnson T, Vinayak A, Kuvaldina A, Skinner OT, Wustefeld-Janssens BG (2020) Comparison of methods to determine primary tumour size in canine apocrine gland anal sac adenocarcinoma. **Journal of Small Animal Practice** 61(3): 185-189.

Skorupski KA, Alarcón CN, Lorimier, LP, LaDouceur EEB, Rodriguez CO, Rebhun RB (2018) Outcome and clinical, pathological, and immunohistochemical factors associated with prognosis for dogs with early-stage anal sac adenocarcinoma treated with surgery alone: 34 cases (2002–2013). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 253(1): 84-91.

Sun X, Kaufman PD (2018) Ki-67: more than a proliferation marker. **Chromosoma** 127(2): 175-186.

Suzuki K, Morita R, Hojo Y, Nomura K, Shibutani M, Mitsumori K (2013) Immunohistochemical characterization of neuroendocrine differentiation of canine anal sac glandular tumours. **Journal of Comparative Pathology** 149(2-3): 199-207.

Tanaka Y, Watanabe M, Saeki K, Ong, SM, Yoshitake R, Imamura S, Nishimura R, Sugano S, Nakagawa T (2020) Evaluation of the proper dosage of lapatinib and its safety in dogs. **Translational and Regulatory Sciences** 2(3): 68-71.

Tao Li L, Jiang G, Chen Q, Zheng, JN (2015) Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer. **Molecular Medicine Reports** 11(3), 1566-1572.

Terragni R, Casadei Gardini AC, Sabattini S, Bettini G, Amadori D, Talamonti C, Vignoli M, Capelli L, Saunders JH, Ricci M, Ulivi P (2014) EGFR, HER-2 and KRAS in canine gastric epithelial tumors: a potential human model. **PLOS one** 9(1): e85388.

Tsuboi M, Sakai K, Maeda S, Chambers JK, Yonezawa T, Matsuki N, Uchida K, Nakayama H (2019) Assessment of HER2 expression in canine urothelial carcinoma of the urinary bladder. **Veterinary Pathology** 56(3): 369-376.

Williams LE, Gliatto JM, Dodge RK, Johnson JL, Gamblin RM, Thamm DH, Lana SE, Szymkowski M, Moore AS (2003) Carcinoma of the apocrine glands of the anal sac in dogs: 113 cases (1985–1995). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 223(6): 825-831.

Withrow SJ, Vail DM, Page RL (6^a ed.) (2020) Small Animal Clinical Oncology. St. Louis: Elsevier, 842p.

Wolff AC, Hammond MEH, et al. (2014) Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine** 138(2):241-256.

Wong H, Byrne S, Rasotto R, Drees R, Taylor A, Priestnall SL, Leo C (2021) A Retrospective Study of Clinical and Histopathological Features of 81 Cases of Canine Apocrine Gland Adenocarcinoma of the Anal Sac: Independent Clinical and Histopathological Risk Factors Associated with Outcome. **Animals** 11(11): 3327.

Wouda RM, Borrego J, Keuler NS, Stein T (2016) Evaluation of adjuvant carboplatin chemotherapy in the management of surgically excised anal sac apocrine gland adenocarcinoma in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology** 14(1): 67-80.

Yan M, Schwaederle M, Arguello D, Millis SZ, Gatalica Z, Kurzrock R (2015) HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. **Cancer and Metastasis Reviews** 34(1): 157-164.

Yarden Y (2001) Biology of HER2 and its importance in breast cancer. **Oncology** 61(2): 1-13.

Yoshimoto S, Kato D, Kamoto S, Yamamoto K, Tsuboi M, Shinada M, Ikeda N, Tanaka Y, Yoshitake R, Eto S, Saeki K, Chambers JK, Kinoshita R, Uchida K, Nishimura R, Nakagawa T (2019a) Detection of human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in canine anal sac gland carcinoma. **Journal of Veterinary Medical Science** 81(7): 1034-1039.

Yoshimoto S, Kato D, Kamoto S, Yamamoto K, Tsuboi M, Shinada M, Ikeda N, Tanaka Y, Yoshitake R, Eto S, Saeki K, Chambers JK, Kinoshita R, Uchida K, Nishimura R, Nakagawa T (2019b) Immunohistochemical evaluation of HER2 expression in canine thyroid carcinoma. **Heliyon** 5(7): e02004.

Yoshimoto S, Kato D, Kamoto S, Yamamoto K, Tsuboi M, Shinada M, Ikeda N, Tanaka Y, Yoshitake R, Eto S, Saeki K, Chambers JK, Hashimoto Y, Uchida K, Nishimura R, Nakagawa T (2020) Overexpression of human epidermal growth factor receptor 2 in canine primary lung cancer. **Journal of Veterinary Medical Science** 82(6): 804-808.

CAPÍTULO 4 – Considerações finais

Consideramos que os objetivos inicialmente traçados para o estudo, foram alcançados, ampliando a investigação acerca dos carcinomas de saco anal, através da realização de um estudo nacional que traça o perfil de maior acometimento da neoplasia, anteriormente demonstrado apenas em estudos internacionais. Bem como comprovando a imunoexpressão de ambos os marcadores, HER2 e Ki67, nesse tipo neoplásico.

Apesar das inúmeras limitações associadas a um estudo retrospectivo, o capítulo 2 permitiu observar, não apenas o perfil epidemiológico, mas também trazer um alerta à prática veterinária no Brasil, demonstrando que o diagnóstico de neoplasias de saco anal tem sido obtido de forma tardia, em relação a realidade demonstrada em estudos internacionais. Acreditamos na necessidade de uma ação educativa, com intuito de tornar rotineira a prática da palpação retal, em animais adultos a idosos, permitindo assim diagnósticos precoces e maior chances de cura, nesse tipo neoplásico.

Por fim, no capítulo 3, apesar de não ser possível obter conclusões acerca do valor prognóstico dos marcadores, acreditamos que a simples confirmação de sua expressão, traga benefícios inúmeros à prática clínica oncológica, uma vez que ambos representam alvos terapêuticos, com maior ênfase no HER2 que já possui drogas inibidoras em fases avançadas de estudo e em comercialização.

Novos estudos são necessários, afim de correlacionar os valores de HER2 e Ki67 a outros fatores clínicos, e à sobrevida dos pacientes, na tentativa de elucidar o seu real valor prognóstico.