UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

AVALIAÇÃO DA QUIMIOTERAPIA METRONÔMICA EM CARCINOMAS MAMÁRIOS DE CADELAS POR IMUNOMARCAÇÕES

Analy Ramos Mendes

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

AVALIAÇÃO DA QUIMIOTERAPIA METRONÔMICA EM CARCINOMAS MAMÁRIOS DE CADELAS POR IMUNOMARCAÇÕES

Analy Ramos Mendes

Orientador: Professor Adjunto Alexandre Lima de Andrade

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - Unesp, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais).

ARAÇATUBA – SP

2014

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Avaliação da quimioterapia metronômica em carcinomas mamários de cadelas por imunomarcações.

AUTORA: ANALY RAMOS MENDES

ORIENTADOR: Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.

Dra. SABRYNA GOUVEIA CALAZANS

Dra. MARIA CECÍLIA RUI LUVIZOTTO

Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

DATA DA REALIZAÇÃO: 15 de agosto de 2014.

Presidente da Comissão Examinadora
Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANALY RAMOS MENDES – Nascida em Sorocaba/SP em 02 de outubro de 1985. Iniciou e concluiu o curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, campus de Araçatuba, no período de 2004 a 2008. Realizou curso de especialização *lato sensu* na área de Clínica Cirúrgica de Cães e Gatos pela Universidade Castelo Branco. Em 2012 Iniciou o programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Ciência Animal (Mestrado), na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Araçatuba, São Paulo. No mesmo ano realizou estágio de treinamento com duração de 6 meses no serviço de Oncologia Veterinária da Michigan State University, Lansing/MI, EUA. Atualmente é docente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral (FAEF/Garça).

"No meio da confusão, encontre a simplicidade.
A partir da discórdia, encontre a harmonia.
No meio da dificuldade reside a oportunidade."
(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Maria Socorro Ramos da Silva
Mendes e Antônio Olegário Mendes.
Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades e pessoas que colocou em minha vida.

À minha família por todo esforço desde minha formação básica para que eu realizasse meus sonhos e conseguisse alcançar cada conquista. Mãe, minha rainha, sem sua perseverança, com certeza eu não realizaria os sonhos que até hoje realizei. Meu amado Pai, seu esforço contínuo até os dias de hoje me dá forças e estímulo para que eu não desista dos meus objetivos. Minhas queridas e amadas irmãs, vocês são o melhor presente de Deus em minha vida e o apoio incondicional de vocês a tudo que faço são a minha maior motivação.

Ao meu atual noivo, futuro marido e grande amor, Heitor, meu agradecimento especial pela paciência, pelos ensinamentos (por ser um pesquisador exemplar me ajudando em todas as etapas do projeto), pelo companheirismo, pelas horas adiadas de almoço e de lazer, pelo carinho, amor, apoio e suporte. Não tenho nem palavras para descrever o quanto você modificou a minha vida e como me fez acreditar no amor verdadeiro. Obrigada.

Ao meu orientador Alexandre Lima de Andrade por ter aceitado me orientar e pela confiança depositada em mim, desde o período de aluna especial além de ter permitido que eu realizasse o estágio no exterior.

Meu agradecimento especial para a Professora Maria Cecília Rui Luvizotto que participou ativamente de cada etapa do meu mestrado, desde a idealização do projeto muito antes do meu ingresso no curso. Muito obrigada pela paciência, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pela atenção sempre que precisei, pelo apoio, pelas risadas, pelas viagens e principalmente pela amizade.

Aos meus animais de estimação que me fazem amar cada dia mais os animais. Aos que vivem ou viveram com minha família em Jaú: Floquinho (que despertou meu interesse pela medicina veterinária), Vitório, Bilu, Mel, Abigail, Chiquinho e Gata. Aos meus companheirinhos em Andradina e Araçatuba, meus gatos amados, Piri e Leopoldo.

A todos os meus amigos e amigas que me ajudaram direta ou indiretamente: Naiara, Natália, Jaqueline, Camila, Celina, Talita, Paloma, Tiago e Andréa. Um especial agradecimento ao meu querido casal de amigos Juliana e Acácio que além da grande amizade, me ajudaram diretamente na realização do projeto me ajudando na realização das mastectomias.

Aos profissionais, professores e funcionários do Hospital Veterinário e da Patologia da FMVA pelo suporte quando necessário.

Às médicas veterinárias da cidade de Araçatuba que me encaminharam casos participantes do meu projeto: Dra. Claudia, Dra. Fabiane e Dra. Maíra.

Aos demais professores da FAEF/Garça também pelo encaminhamento de casos participantes do projeto e pelo suporte e amizade.

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

Aos proprietários e animais participantes do projeto. Acima de ser apenas um projeto de pesquisa, o meu intuito foi de realmente buscar mais uma opção terapêutica para as cadelas que sofrem com tumores de mama e são tratadas de forma errônea muitas vezes.

A todos os meus pacientes oncológicos, obrigada por cada olhar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro ao projeto (Proc. 2013/07252-5).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da FMVA da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, pela oportunidade oferecida para a realização do curso de Mestrado.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS..... 12
Revisão de Literatura..... 12
Objetivos..... 22
Referências..... 22
CAPÍTULO 2 – DENSIDADE MICROVASCULAR EM CARCINOMAS MAMÁRIOS DE CADELAS COMO FATOR PREDITIVO À QUIMIOTERAPIA METRONÔMICA..... 29
Introdução..... 30
Materiais e Métodos..... 31
Animais..... 31
Grupos..... 31
Quimioterapia Metronômica..... 32
Histopatologia..... 32
Imuno-histoquímica e Densidade Microvascular..... 33
Análise estatística..... 33
Resultados..... 33
Características clínicas..... 33
Efeitos Adversos..... 34
Histopatologia e Imuno-histoquímica..... 35
Discussão..... 36
Conclusões..... 39
Referências..... 39
CAPÍTULO 3 - QUIMIOTERAPIA METRONÔMICA INDUZ EFEITOS ANTIANGIOGÊNICOS E PRÓ-APOPTÓTICOS EM CARCINOMAS MAMÁRIOS DE CADELAS..... 44
Introdução..... 45
Materiais e Métodos..... 46
Animais..... 46

Grupos..... 47
Quimioterapia Metronômica..... 47
Histopatologia..... 47
Imuno-histoquímica..... 48
Análise estatística..... 48
Resultados..... 49
Características clínicas..... 49
Efeitos colaterais..... 50
Histopatologia e Imuno-histoquímica..... 50
Acompanhamento e sobrevida..... 55
Discussão..... 55
Conclusões..... 60
Referências..... 61
APÊNDICES..... 67
Apêndice A..... 68

AVALIAÇÃO DA QUIMIOTERAPIA METRONÔMICA EM CARCINOMAS MAMÁRIOS DE CADELAS POR IMUNOMARCAÇÕES

RESUMO – A neoplasia mamária canina (NMC) é o tipo de neoplasia que mais comumente afeta cadelas não castradas. A terapia para a NMC é um desafio já que não são descritos tratamentos efetivos para neoplasias de alto grau histológico. Uma possibilidade terapêutica que age diminuindo a angiogênese tumoral é a quimioterapia metronômica (QM). Tem sido proposta a quantificação da angiogênese tumoral através da mensuração do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e da densidade microvascular (DMV). Desta forma, neste estudo, foi avaliada a resposta de carcinomas mamários caninos à QM por mensuração da DMV e detecção do VEGF tecidual, índice apoptótico (IA) e índice de proliferação celular (IP). Foram utilizadas 28 cadelas com carcinomas mamários, distribuídas igualmente em um grupo controle (GC) tratadas com mastectomia e um grupo tratado (GT) com QM (ciclofosfamida 15mg/m^2 e piroxicam 0,3mg/kg) ambos por via oral e diariamente durante 28 dias seguido de mastectomia. As neoplasias mamárias foram classificadas e graduadas histologicamente. DMV, grau do VEGF tecidual, IA e IP de todas as neoplasias foram obtidas por imunomarcação. A análise estatística mostrou diferença entre os grupos na DMV e IA ($p<0.05$), evidenciando redução quantitativa na microvasculatura tumoral e aumento na apoptose de células neoplásicas. Com base neste resultado, é possível afirmar que a QM possui efeitos antiangiogênicos e pró-apoptóticos em carcinomas mamários de cadelas e pode ser utilizada como uma nova opção terapêutica.

Palavras-chave: cães, fêmeas, mastectomia, neoplasia mamária, quimioterapia adjuvante, quimioterapia metronômica.

EVALUATION OF METRONOMIC CHEMOTHERAPY IN CANINE MAMMARY CARCINOMAS THROUGH IMMUNOSTAINING

SUMMARY – The canine mammary tumor (CMT) is the neoplasia that most commonly affects not spayed bitches. Therapy for CMT is a challenge since there are not described effective treatments for high-grade tumors. A therapeutic option that slows down tumor angiogenesis is metronomic chemotherapy (MC). Quantification of tumor angiogenesis has been proposed by measuring the vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density (MVD). Thus, in this study, the response of canine mammary carcinomas by the MC was evaluated by the measurement of MVD and tissue VEGF detection, apoptotic index (AI) and cell proliferation index (PI). Twenty-eight dogs with malignant CMT, equally distributed into a control group (CG) treated with mastectomy and a treated group (TG) treated with MC (cyclophosphamide 15mg/m^2 and piroxicam 0.3 mg/kg) both orally and daily for 28 days followed by mastectomy. Mammary tumors were classified and graded histologically. MVD, tissue VEGF, AI and PI of all malignancies were obtained by immunostaining. The analysis showed statistical difference between groups in MVD and AI ($p < 0.05$), showing quantitative reduction in tumor microvasculature and increase in tumor cells apoptosis. Based on this result, we can affirm that MC has antiangiogenic and proapoptotic effects in mammary carcinomas of bitches and can be used as a new therapeutic option.

Keywords: adjuvant chemotherapy, dogs, female, mammary tumor, mastectomy, metronomic chemotherapy.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

REVISÃO DE LITERATURA

A neoplasia mamária canina (NMC) é o tipo de neoplasia que mais comumente afeta cadelas não castradas. Estudos europeus mostram incidência de aproximadamente 200 em 100.000 cadelas acometidas por ano (SLEECKX et al., 2011). A incidência da NMC tem decaído nos Estados Unidos da América e na Europa Ocidental, em função da usual prática da ovário-histerectomia (OH) em idade precoce (EGENVALL et al., 2005; MOE, 2001). Na Escandinávia e Espanha a incidência de NMC é elevada, já que a OSH como medida profilática não é utilizada rotineiramente (EGENVALL et al., 2005; MOE, 2001; PEREZ ALENZA et al., 2001).

A ocorrência desse neoplasma demonstra um aumento progressivo com a idade, sendo que aos 6 anos é de 1%; aos 8 anos, 6% e aos 10 anos, 13%. (EGENVALL et al., 2005). A média de idade está entre 10 a 11 anos, com raras ocorrências em cadelas com menos de quatro anos, sendo as raças Poodle e Teckel predispostas (GOTTWALD, 1998; PRIESTER; McKAY, 1980). Na apresentação clínica, a glândula mamária abdominal caudal e as mamas inguinais são as mais frequentemente afetadas e 50 a 70% das cadelas com NMC têm múltiplas mamas acometidas por diferentes tipos histopatológicos ocorrendo em um mesmo animal (SLEECKX et al., 2011).

O desenvolvimento da neoplasia mamária canina é claramente hormônio-dependente. Em cadelas, a OSH precoce oferece um considerável efeito protetor contra o carcinoma mamário e, se realizada em animais adultos, a OH pode ainda reduzir o risco de desenvolvimento de tumores mamários benignos (MISDORP, 1988). Em mulheres, um efeito protetor da gestação precoce é bem conhecido, o que ainda não foi demonstrado em animais domésticos (SCHNEIDER et al., 1969).

O risco de tumor mamário causado por esteroides ovarianos, marcadamente pela progesterona, ocorre em razão de sua atividade mitogênica em células mamárias, exercida após a ligação com os respectivos receptores. O tecido glandular mamário normal contém receptores de estrogênio e receptores de progesterona em níveis altos, porém, carcinomas mamários sem resquício de tecido epitelial normal, contêm estes receptores em quantidade diminuída, em alguns casos (DONNAY et al., 1995; MacEWEN et al., 1982).

Com base na histopatologia, 41 a 53% das NMCs são malignas, porém evidências histológicas de malignidade não necessariamente implicam um curso clínico maligno (BRODEY et al., 1983). Além desse aspecto, variação na classificação histológica pode ocorrer em uma mesma massa tumoral (BRODEY et al., 1983). Baseado em um estudo, hipotetizou-se que uma neoplasia maligna pode se desenvolver a partir de um tumor benigno pré-existente (SORENMO et al., 2009).

A maioria das NMCs é carcinoma e menos de 5% são sarcomas (LANA et al., 2007; SLEECKX et al., 2011). Sorenmo et al. (2009) revelou que cadelas com neoplasias mamárias malignas eram significativamente mais velhas que aquelas com tumores benignos, e que tumores malignos eram significativamente maiores que os benignos. Além disso, foi revelado que cadelas com lesões histopatológicas pré-malignas (hiperplasia e carcinoma *in situ*) possuem um aumento significativo no risco de desenvolverem uma nova NMC maligna (MOUSER et al., 2010).

Sistemas de classificação histopatológica das NMCS têm sido empregados com intuito de reconhecer os padrões teciduais neoplásicos. A classificação mais aceita e utilizada é a estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) onde são descritos e subdivididos carcinomas não infiltrativos, carcinomas complexos, carcinomas simples (tubulopapilífero, sólido e anaplásico), sarcomas e tumores benignos (Tabela 1). No Brasil, Cassali et al. (2011) propuseram uma classificação após um consenso entre profissionais que militam na oncologia veterinária. Adotaram, por base, os critérios

estabelecidos por Misdorp et al. (1999) publicado pela AFIF (Instituto de Patologia das Forças Armadas). As Tabelas 1 e 2 apresentam a classificação histológica dos tumores mamários segundo Misdorp et al. (1999) e Cassali et al. (2011).

Cadelas com neoplasias mamárias geralmente são diagnosticadas com um ou mais nódulos na glândula mamária e, ocasionalmente, estes nódulos podem ser achados incidentais no exame físico de uma consulta de rotina, momento em que a maioria dos animais encontra-se saudável nos estágios iniciais (CASSALI et al., 2011; SORENMO, 2003).

Metástases de neoplasia mamária podem ou não estar presentes e, quando presentes, as cadelas podem apresentar sinais clínicos inespecíficos como fadiga, letargia, perda de peso, dispneia, tosse e claudicação (SLEECKX et al., 2011). Carcinomas mamários comumente causam metástases por via linfática aos linfonodos regionais e pulmão, porém a extensão e localização da metástase determinam a ocorrência e gravidade dos sinais clínicos (LANA et al., 2007; MISDORP, 2002; SORENMO, 2003). Outros sítios menos comumente relatados de metástase são fígado, ossos, cérebro, baço, rins, olhos, glândulas adrenais, útero, coração, musculatura e pâncreas (CLEMENTE et al., 2010; LANA et al., 2007; MISDORP, 2002).

Uma suspeita inicial de NMC é baseada em dados de resenha (raça, sexo, idade), anamnese (ciclos reprodutivos, castração, lactação, terapia com progesterona) e exame físico que compreende uma avaliação geral do animal, seguida por palpação e inspeção minuciosa de todas as glândulas mamárias (LANA et al., 2007; MISDORP, 2002; SORENMO, 2003). A palpação também deve se estender aos linfonodos regionais, como os axilares e inguinais que, geralmente, apenas se tornam palpáveis quando aumentados de volume (ROMAGNOLI, 2005). NMCs benignos, em geral, apresentam-se como nódulos pequenos, com bordos bem demarcados e firmes à palpação; já as neoplasias mamárias malignas apresentam sinais que incluem rápido crescimento, bordos indefinidos, ulceração ou inflamação, fixos à pele ou aos tecidos subjacentes (LANA et al., 2007).

Tabela 1 - Classificação Histológica dos Tumores Mamários Caninos

Tumores Malignos
Carcinoma Não infiltrativo (in situ)
Carcinoma Complexo
Carcinoma Simples
Carcinoma tubulopapilífero
Carcinoma sólido
Carcinoma anaplásico
Tipos especiais de carcinomas
Carcinoma de células fusiformes
Carcinoma de células escamosas
Carcinoma mucinoso
Carcinoma rico em lipídeos
Sarcomas
Fibrossarcoma
Osteossarcoma
Outros sarcomas
Carcinossarcoma
Carcinoma ou Sarcoma em tumores benignos
Tumores Benignos
Adenoma
Adenoma simples
Adenoma complexo
Adenoma basalóide
Fibroadenoma
Fibroadenoma de baixa celularidade
Fibroadenoma de alta celularidade
Tumor Misto Benigno
Papiloma de ducto

Fonte: Misdorp et al. (1999).

O diagnóstico da NMC deve incluir avaliações hematológica e bioquímica sérica, citológica de aspirado por agulha fina da neoplasia e dos linfonodos regionais (quando aumentados de volume), e, para pesquisa de metástase, técnicas de imagem como radiografia torácica e ultrassonografia abdominal (LANA et al., 2007; SLEECKX et al., 2011). A histopatologia é imprescindível para o diagnóstico definitivo e classificação do tumor e, se múltiplas massas estão presentes em um mesmo animal, elas devem ser avaliadas individualmente (MISDORP, 2002; SORENMO, 2003; SORENMO et al., 2009).

Tabela 2 - Classificação Histológica de Neoplasias Mamárias Caninas proposta por Cassali et al. (2011)

Tumores
Lesões epiteliais não-neoplásicas
Hiperplasia epitelial
Hiperplasia ductal
Hiperplasia lobular
Adenose
Lesões das células colunares
Alterações das células colunares
Hiperplasia das células colunares
Lesões atípicas das células colunares
Tumores Benignos
Adenoma
Adenoma complexo ou adenomioepitelioma
Adenoma basalóide
Fibroadenoma
Tumor misto benigno
Papiloma ductal
Tumores malignos
Carcinomas
Carcinoma *in situ*
Carcinoma ductal *in situ*
Carcinoma lobular *in situ*
Carcinoma misto
Carcinoma Complexo ou adenomioepitelioma maligno
Carcinoma papilar
Carcinoma tubular
Carcinoma sólido
Tipos especiais de carcinomas
Carcinoma micropapilar
Carcinoma lobular invasivo
Carcinoma lobular pleomórfico
Carcinoma secretório
Carcinoma mucinoso
Carcinoma rico em lipídeos
Carcinoma de células escamosas
Carcinoma de células fusiformes
Carcinoma anaplásico
Neoplasias mamárias com diferenciação sebácea
Sarcomas
Fibrossarcoma
Osteossarcoma
Carcinosarcoma
Sarcoma misto
Outros sarcomas
Condrossarcoma puro
Lipossarcoma
Hemangiosarcoma

Fonte: Cassali et al. (2011).

Estadiamento clínico preciso é de extrema importância antes de se iniciar qualquer variação de terapia (Tabela 3). Como requisitos importantes para serem avaliados estão: o tumor primário, os linfonodos regionais e identificar metástases à distância (LANA et al., 2007).

A terapia para a neoplasia mamária de cães ainda é um desafio e existem diversas terapêuticas atualmente empregadas e com resultados adversos. A cirurgia continua sendo a técnica de escolha para os tumores mamários de cadelas, com exceção daquelas com carcinoma inflamatório (MISDORP, 2002).

Cadelas com lesões benignas e 50% das cadelas com neoplasias malignas serão curadas apenas com a excisão cirúrgica (STRAW, 2005). As outras 50% com neoplasmas malignos apresentam micrometástases no momento do ato cirúrgico, o que poderá provocar o óbito (MISDORP, 2002). A abordagem cirúrgica depende do tamanho do tumor, localização, número de mamas afetadas e condição clínica e laboratorial da paciente (CASSALI et al., 2011; FOSSUM; HEDLUND, 1997).

Tabela 3 - Estadiamento dos Tumores Mamários Caninos

Sistema Modificado
T- Tumor Primário
T_1 <3 cm diâmetro máximo
T_2 3-5 cm diâmetro máximo
T_3 >5 cm diâmetro máximo
N- Linfonodos regionais
N_0 Histológico ou citológico — Sem metástases
N_1 Histológico ou citológico — Metástases presentes
M- Metástase à distância
M_0 Metástase à distância não detectada
M_1 Metástase à distância detectada
Estadios
I: T_1 N_0 M_0
II: T_2 N_0 M_0
III: T_3 N_0 M_0
IV: Nenhum T N_1 M_0
V: Nenhum T Nenhum N M_1

Fonte: Owen (1980).

Outras terapias para neoplasias mamárias caninas, como a radioterapia, necessitam de maiores estudos, porém esta técnica tem um papel limitado pela extensão das neoplasias mamárias, sendo que sua exequibilidade pode ser considerável apenas em cadelas com tumores extensos para tolerar um procedimento cirúrgico e para o carcinoma inflamatório (LANA et al., 2007).

Embora a quimioterapia adjuvante seja o tratamento padrão para neoplasias mamárias em humanos, pouca informação existe sobre sua real eficácia para tumores de mama em cães. A quimioterapia tradicional tem avançado rapidamente na medicina veterinária nas últimas décadas e quimioterápicos têm sido aplicados com sucesso em diferentes tipos de neoplasias (MUTSAERS, 2009).

Os quimioterápicos citotóxicos convencionais, como a ciclofosfamida, agem causando dano direto ao DNA celular, no seu ciclo de divisão celular, com intuito de destruir o máximo possível de células com o uso da dose máxima tolerável (DMT) (BROWDER et al., 2000). Browder et al. (2000) destacaram o fato de que alguns fármacos, além desses mecanismos de ação, também agem por um mecanismo secundário através da inibição da angiogênese tumoral. Para o crescimento —normal” de tumores sólidos, novos vasos são recrutados para trazer às células neoplásicas oxigênio e para removerem restos celulares; este processo é chamado de angiogênese (MUTSAERS, 2009). Os efeitos antiangiogênicos de certos quimioterápicos podem ser anulados devido aos prolongados intervalos de tempo entre os ciclos tradicionais que utilizam a DMT (BROWDER et al., 2000).

A DMT visa administrar a dose máxima do fármaco que pode ser tolerada pelo paciente, com a ressalva de que os efeitos adversos tendem a ser maiores e, tanto os proprietários de animais como os médicos veterinários, geralmente são pouco receptivos às consequências, dessa maneira, as doses utilizadas em medicina veterinária acabam sendo muito menores do que as utilizadas na oncologia humana (MUTSAERS, 2009). Além disso, se a toxicidade é esperada, os ciclos de quimioterapia com DMT requerem um intervalo entre aplicações em torno de 3 a 4 semanas ou mais de duração,

suficiente para permitir que os tecidos normais susceptíveis às drogas, como o epitélio intestinal e a medula óssea, recuperem-se antes da próxima aplicação (MUTSAERS, 2009).

O inconveniente da quimioterapia com uso de DMT, por uma perspectiva antiangiogênica, envolve o fato de que o intervalo de tempo entre os ciclos permite ao componente endotelial do tumor uma oportunidade de reparo aos danos provocados pela antiangiogênese do quimioterápico (KLEMENT et al., 2000; MUTSAERS, 2009).

Browder et al. (2000) propuseram uma estratégia para otimizar os efeitos antiangiogênicos da quimioterapia utilizando a administração contínua de algumas drogas em um esquema mais frequente de doses mais baixas do que as DMTs, retirando-se os longos intervalos entre os ciclos. Este conceito de tratamento tem sido referido como quimioterapia contínua em baixa dose, quimioterapia antiangiogênica ou, a mais utilizada, quimioterapia metronômica (QM) (MUTSAERS, 2009).

Estudos clínicos demonstram que a quimioterapia metronômica controla a resistência aos quimioterápicos, exibe sinergismo quando combinada com agentes antiangiogênicos e controla o crescimento tumoral, através da inibição das células endoteliais e das células progenitoras endoteliais circulantes (BERTOLINI et al., 2003). Dessa forma, o baixo-custo, a comodidade e os aceitáveis efeitos adversos destes protocolos, os fazem atrativos para uso veterinário (MUTSAERS, 2009).

Tem sido sugerido que a quantificação da angiogênese pode ajudar a predizer como a neoplasia irá progredir ou se aquele tumor irá responder ao tratamento (GASPARINI et al., 2001; MARSON et al., 2001). A neoplasia mamária invasiva ou *in situ* expressa diversos fatores angiogênicos, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é uma glicoproteína produzida por células normais e neoplásicas e importante regulador de angiogênese fisiológica e patológica, sendo detectado em todos os estágios tumorais (COLLEONI et al., 2002; GIOVANINI et al., 2010; YAMASHITA-KASHIMA et al., 2012). A expressão tecidual de VEGF nas neoplasias

mamárias malignas está aumentada e se relaciona com pior prognóstico e menor sobrevida em pacientes humanos (RODRIGUES et al., 2012; YAMASHITA-KASHIMA et al., 2012).

Em humanos, pesquisas clínicas com terapias antiangiogênicas procuram alcançar e monitorar os bons resultados da terapia. Assim, pesquisadores têm proposto quantificar a vasculatura tumoral com a densidade microvascular (DMV) (ARNES et al., 2012). A DMV revela o grau da atividade angiogênica da neoplasia, sendo esta um marcador da eficácia dos agentes antiangiogênicos, e também elege os pacientes candidatos à terapia antiangiogênica (BIESAGA et al., 2012; HLATKY et al., 2002).

A DMV pode ser inversamente proporcional à sobrevida de mulheres portadoras de neoplasias mamárias (MARTIN et al., 1997). Estudos pré-clínicos confirmaram que a angiogênese possui um papel central na carcionogênese do tumor de mama e no seu potencial metastático, pois a DMV da neoplasia é conhecida por ser preditiva de micrometástases na medula óssea, recidiva da neoplasia e sobrevivência; estabelecendo a angiogenêse como um potencial alvo terapêutico para tumores de mama (MACKEY et al., 2012).

Para a mensuração da DMV existem anticorpos monoclonais que se ligam aos antígenos das células endoteliais são utilizados permitindo a visualização dos vasos; neste sentido, o anticorpo CD31 é o mais utilizado (MARTIN et al., 1997). Na medicina veterinária existem ainda poucas pesquisas relacionadas à QM ou terapia antiangiogênica, bem como a avaliação dessa terapia.

Zhao et al. (2005) trataram, com ciclofosfamida e talidomida, em doses metronômicas, carcinomas prostáticos implantados em ratos e avaliaram a resposta com o uso de ressonância magnética e com marcadores imuno-histoquímicos, ambos com o objetivo de avaliar a vasculatura tumoral. Como resultados, as neoplasias tratadas, quando comparadas às não tratadas, apresentaram menor crescimento tumoral, padrão diferenciado de necrose,

maior número de microtromboses e um significativo aumento da apoptose das células tumorais e das células endoteliais da neoplasia.

Elmslie et al. (2008) aplicaram a QM em cães com sarcomas de tecidos moles parcialmente excisados utilizando como quimioterápicos a ciclofosfamida e o piroxicam, ambos diariamente e por via oral durante 6 meses e compararam os resultados com um grupo controle de animais com a mesma neoplasia e não tratados. Os resultados revelaram que o intervalo livre de doença dos animais tratados foi significativamente maior se comparado aos animais do grupo controle, apesar dos animais tratados (40%) apresentarem ligeira toxicidade (vômito, anorexia e cistite hemorrágica).

Também em cães com sarcomas de tecidos moles, baixas doses de ciclofosfamida foram administradas durante 28 dias visando estabelecer a melhor dose deste quimioterápico, concluindo que 15mg/m^2 diariamente apresenta melhores resultados do que 12,5mg/m^2 em um esquema de QM, sendo esta dose capaz de reduzir significativamente a DMV das neoplasias tratadas (BURTON et al., 2011).

Em cadelas com adenocarcinomas simples de glândula mamária, foi demonstrada correlação moderada entre expressão de VEGF tecidual e grau histológico, além de forte relação entre proliferação tumoral (dado acessado via DMV) e grau histológico da neoplasia (AL-DISSI et al., 2010). A DMV em neoplasias mamárias caninas avaliada através de imuno-histoquímica apresentou correlação com o grau histológico; assim, os altos graus foram acompanhados de elevadas DMVs demonstrando que a angiogênese tem valor prognóstico na medicina veterinária (JAKAB et al., 2008). Não existem resultados, até o momento, sobre a resposta das neoplasias mamárias caninas à quimioterapia metronômica.

OBJETIVOS

- Avaliar a resposta clínica de carcinomas mamários frente ao tratamento com quimioterapia metronômica usando ciclofosfamida e piroxicam em cadelas;
- Pesquisar o uso da DMV como fator preditivo à quimioterapia metronômica em neoplasias mamárias caninas.
- Detectar a reposta dos carcinomas mamários caninos à quimioterapia metronômica através da mensuração da densidade microvascular, VEGF tecidual, índice apoptótico e índice de proliferação celular.

REFERÊNCIAS

AL-DISSI, A.N.; HAINES, D.M.; SINGH, B.; KIDNEY, B.A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. **Can. Vet. J.,** v.51, p.1109-1114, 2010.

ARNES, J.B.; STEFANSSON, I.M.; STRAUME, O.; BAAK, J.P.; LONNING, P.E.; FOULKES, W.D.; AKSLEN, L.A. Vascular proliferation is a prognostic factor in breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat**., v.133, p.501–510, 2012.

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

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

BRODEY, R.S.; GOLDSCHMIDT, M.A.; ROSZEL, J.R. Canine mammary gland neoplasms. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.,** v.19, p.61-90, 1983.

BROWDER, T.; BUTTERFIELD, C. E.; KRALING, B. M.; MARSHALL, B.; O'REILLY, M. S.; FOLKMAN, J. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. **Cancer Res**., v. 60, p.1878–1886, 2000.

BURTON, J.H.; MITCHELL, L.; THAMM, D.H.; DOW, S.W.; BILLER, B.J. Low-dose cyclophosphamide selectively decreases regulatory T Cells and inhibits angiogenesis in dogs with soft tissue sarcoma. **J. Vet. Intern. Med.,** v.25, p. 920-926, 2011.

CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; ANDRIGO, B.N. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Braz. J. Vet. Pathol.,** v.4, n.2, p.153-180, 2011.

CLEMENTE, M.; PEREZ-ALENZA, M.D.; PENA, L. Metastasis of canine inflammatory versus non-inflammatory mammary tumours. **J. Comp. Pathol.,** v.143, p.157–163, 2010.

COLLEONI, M.; ROCCA, A.; SANDRI, M.T.; ZORZINO, L.; MASCI, G.; NOLÈ, F.; PERUZZOTTI, G.; ROBERTSON, C.; ORLANDO, L.; CINIERI, S.; De BRAUD, F.; VIALE, G.; GOLDHIRSCH, A. Low-dose oral methotrexate and cyclophosphamide in metastatic breast cancer: antitumor activity and correlation with vascular endothelial growth factor levels. **Ann. Oncol.,** v.13, p.73-80, 2002.

DONNAY, I.; RAUIS, J; DEVLEESCHOUWER, N. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. **Am. J. Vet. Res**., v.56, p.1188-1194, 1995.

EGENVALL, A.; BONNETT, B.N.; OHAGEN, P.; OLSON, P.; HEDHAMMAR, A.; VON EULER, H. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. **Prev. Vet. Med.,** v.69, p.109–127, 2005.

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

FOSSUM, T.W.; HEDLUND, C.S. Mammary neoplasia. In: DUNCAN L. **Small animal surgery.** St-Louis: Don Ladig, 1997, p. 539–544,

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

GIOVANNINI, M.; ALDRIGHETTI, D.; ZUCCHINELLI, P.; BELLI, C.; VILLA, E. Antiangiogenic strategies in breast cancer management. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.,** v.76, p.13–35, 2010.

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

HLATKY, L.; HAHNFELDT, P.; FOLKMAN, J. Clincal application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn´t tell us. **J. Nat. Cancer Inst.,** v.94, n.12, p.883-893, 2002.

JAKAB, C.; HALÁSZ, J.; KISS, A.; SCHAFF, Z.; SZÁSZ, A.M.; RUSVAI, M.; ABONYI, T.; KULKA, J. Evaluation of microvessel density (MVD) in canine

mammary tumours by quantitative immunohistochemistry of the claudin-5 molecule. **Acta Vet. Hung.,** v.56, n.4, p.495-510, 2008.

KLEMENT, G.; BARUCHEL, S.; RAK, J.; MAN, S.; CLARK, K.; HICKLIN, D.J.; BOHLEN, P.; KERBELL, R.S. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. **J. Clinic. Invest.,** v.105, n.8, p.15-24, 2000.

LANA, S.E.; RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: MacEWEN, E.G.; WITHROW, S.J. **Small animal oncology.** Philadelphia: Saunders Company, 2007, p.619-636.

LUNA, L. G. Rotine staining procedures. In: LUNA, L. G. (eds) **Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology.** New York: McGrae-Hill Book, 1968, Cap. 4 p.32-46.

MacEWEN, E.G.; PATNAIK, A.K.; HARVEY, H.J. Estrogen receptors in canine mammary tumors. **Cancer Res**., v.42, p.2255-2259, 1982.

MACKEY, J.R.; KERBEL, R.S.; GELMON, K.A.; McLEOD, D.M.; CHIA, S.K.; RAYSON, D.; VERMA, S.; COLLINS, L.L.; PATERSON, A.H.G.; ROBIDOUX, A.; PRITCHARD, K.I. Controlling angiogenesis in breast cancer: a systematic review of anti-angiogenic trials. **Cancer Treat. Rev.,** v.38, n.6, p.673-688, 2012.

MARCHETTI, V.; GIORGI, M.; FIORAVANTI, A.; FINOTELLO, R.; CITI, S.; CANU, B.; ORLANDI, P.; Di DESIDERO, T.; DANESI, R.; BOCCI, G. First-line metronomic chemotherapy in a metastatic model of spontaneous canine tumours: a pilot study. **Invest. New Drugs.,** v.30, n.4, p.1725-1730, 2012.

MARSON, L.P.; KURIAN, K.M.; MILLER, W.R.; DIXON, J.M. The effect of tamoxifen on breast tumour vascularity. **Breast Cancer Res. Treat.,** v.66, p.9–15, 2001.

MARTIN, L.; GREEN, B.; RENSHAW, C.; LOWE, D.; RUDLAND, P.; LEINSTERL, S.J.; WINSTANLEY, J. Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. **Br. J. Canc.,** v.76, n.8, p.1046-1054, 1997.

MILLANTA, F.; LAZZERI, G.; VANNOZZI, I.; VIACAVA, P.; POLI, A. Correlation of vascular endothelial growth factor expression to overall survival in feline invasive mammary carcinomas. **Vet. Pathol.,** v.39, p.690– 696, 2002.

MISDORP, W. Canine mammary tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. **Vet. Quart.,** v.10, p.26-33, 1988.

MISDORP, E. R.; HELLMAN, E. Histologic classification of mammary tumors of the dog and cat. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL. **Histological classification of tumors of domestic animals.** Washington, DC: WHO, 1999, s.2.

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

MOE, L. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. **J. Reprod. Fertil. Suppl.,** v.57, p.439–443, 2001.

MOUSER, P.; MILLER, M.A.; ANTUOFERMO, E.; BADVE, S.S.; MOHAMMED, S.I. Prevalence and classification of spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs without clinical mammary disease. **Vet. Pathol.,** v.47, p.275–284, 2010.

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

OWEN, L.N. **Classification of tumors in domestic animals.** In: World Health Organization. 1ed. Geneva, Switzerland: WHO, 1980. p. 26-32.

PEREZ-ALENZA, M.D.; TABANERA, E.; PENA, L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995–1999). **J. Am. Vet. Med. Assoc.,** v.219, p.1110–1114, 2001.

PRIESTER, W.A.; McKAY, F.W. The occurrence of tumors in domestic animals. Bethesda, MD: **Nat. Canc. Instit.**, 1980. NCI Monograph 54

RODRIGUES, P.; FURRIOL, J.; TORMO, E.; BALLESTER, S.; LLUCH, A.; EROLES, P. The single-nucleotide polymorphisms +936 C/T VEGF and 2710 C/T VEGFR1 are associated with breast cancer protection in a Spanish population. **Breast Cancer Res. Treat.,** v.133, n.2, p.769-778, 2012.

ROMAGNOLI, S. Mammary gland tumors. In: REPRODUCTION IN COMPANION, EXOTIC AND LABORATORY ANIMALS. EVSSAR-ENVN Reproduction in companion, exotic and laboratory animals. 2005. Proceedings: EVSSAR-ENVN, 2005. P.1-12.

SCHNEIDER, R.; DORN, C.R.; TAYLOR, D.O.N. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **J. Natl. Cancer Inst.,** v.43, p.1249-1261, 1969.

SLEECKX, N.; ROOSTER, H.; VELDHUIS, K.E.J.B.; VAN GINNEKEN, C.; VAN BRANTEGEM, L. Canine Mammary Tumors, an Overview. **Reprod. Dom. Anim.** v.46, n.6, p.1112-1132, 2011.

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

SORENMO, K.U.; KRISTIANSEN, V.M.; COFONE, M.A.; SHOFER, F.S.; BREEN, A.M.; LANGELAND, M.; MONGIL, C.M.; GRONDAHL, A.M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M.H. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Vet. Comp. Oncol.,** v.7, p.162–172, 2009.

STRAW, R.C. Treatment of mammary gland tumors and perianal neoplasia. **The North American Veterinary Conference (NAVC).** Orlando, Florida. 2005.

YAMASHITA-KASHIMA, Y.; FUJIMOTO-OUCHI, K.; YOROZU, K.; KURASAWA, M.; YANAGISAWA, M.; YASUNO, H.; MORI, K. Biomarkers for antitumor activity of bevacizumab in gastric cancer models. **BMC Cancer.,** v.12, n.37, p.1-12, 2012.

ZHAO, D.; JIANG, L.; HAHN, E.W.; MASON, R.P. Continuous low-dose (metronomic) chemotherapy on rat prostate tumors evaluated using MRI in vivo and comparison with histology. **Neoplasia.** v.7, n.7, p.678-687, 2005.

CAPÍTULO 2 – Densidade microvascular de carcinomas mamários de cadelas como fator preditivo à quimioterapia metronômica

Densidade microvascular de carcinomas mamários de cadelas como fator preditivo à quimioterapia metronômica

RESUMO - A terapia para a neoplasia mamária canina é um desafio, já que não estão descritos tratamentos efetivos para neoplasias de alto grau histológico. Uma possibilidade terapêutica que age diminuindo a angiogênese tumoral é a quimioterapia metronômica (QM). Neste estudo foi proposta a mensuração da densidade microvascular (DMV) como fator preditivo à utilização da QM em neoplasias mamárias caninas. Foram utilizadas 20 cadelas com carcinomas mamários malignos, sendo um grupo controle (GC, n=10) tratado por mastectomia e um grupo tratado (GT, n=10), em que foi empregada a QM com ciclofosfamida 15 mg/m^2 e piroxicam 0,3 mg/kg, ambos, por via oral e diariamente, durante 28 dias, seguido de mastectomia. As neoplasias mamárias foram classificadas histologicamente e graduadas. A DMV foi obtida por imunomarcação com o anticorpo CD31 e quantificada segundo Martin et al. (1997). O envolvimento metastático dos linfonodos regionais foi avaliado por imunomarcação para pancitoqueratina. Análise estatística mostrou diferença na densidade microvascular entre os grupos ($p<0.05$), com a média no GC: 81.7 microvasos e no GT: 59.5 microvasos, evidenciando redução quantitativa na microvasculatura tumoral no grupo tratado. Com base neste resultado é possível afirmar que a DMV pode vir a ser um fator preditivo de importância para a seleção das cadelas com carcinomas mamários a serem beneficiadas com o uso da QM.

Palavras-chave: cães, ciclofosfamida, neoplasias mamárias, piroxicam, microvasos.

INTRODUÇÃO

A neoplasia mamária canina (NMC) é o tipo de neoplasia mais comum em cadelas não castradas, cujo aumento progressivo na incidência, está relacionado à idade, sendo, aos 6 anos, de 1%; aos 8 anos, 6% e aos 10 anos, de 13%. (EGENVALL et al., 2005). Considerando-se análises histopatológicas, 41% a 53% das NMCs são consideradas malignas, porém evidências histológicas de malignidade não necessariamente implicam em um curso clínico maligno (BRODEY et al., 1983).

Cadelas com neoplasias benignas e 50% das cadelas com neoplasias malignas podem ser curadas apenas com a excisão cirúrgica (STRAW, 2005). Os outros 50% com tumores malignos já apresentam micro-metástases no momento do ato cirúrgico, e necessitam, portanto, da associação de outras terapias (MISDORP, 2002). Embora a quimioterapia adjuvante seja o tratamento padrão para neoplasias mamárias em humanos, existem poucas informações sobre sua real eficácia para os tumores de mama em cães (MUTSAERS, 2009).

Browder et al. (2000) propuseram uma estratégia para otimizar os efeitos antiangiogênicos da quimioterapia convencional com a utilização contínua de alguns fármacos, em um esquema de administração contínua em doses baixas. Este conceito de tratamento tem recebido algumas nomenclaturas como quimioterapia contínua em baixa dose, quimioterapia antiangiogênica ou, a mais utilizada, quimioterapia metronômica (QM) (MUTSAERS, 2009). Estudos clínicos demonstraram a capacidade da QM em controlar a resistência aos quimioterápicos, por apresentar sinergismo quando combinada com agentes antiangiogênicos. Ainda, atuar no controle do crescimento tumoral através da inibição da proliferação das células endoteliais e das células progenitoras endoteliais circulantes (BERTOLINI et al., 2003).

É sugerido que a angiogênese possa auxiliar a predizer como a neoplasia irá progredir ou se o tumor irá responder ao tratamento (GASPARINI et al., 2001; MARSON et al., 2001). Para este fim, a quantificação da

vasculatura tumoral com a densidade microvascular (DMV) foi proposta (ARNES et al., 2012). A DMV revela o grau da atividade angiogênica na neoplasia, o que pode ser usado como um marcador da eficácia da terapia antiangiogênica e, também, como fator preditivo para esta modalidade terapêutica (BIESAGA et al., 2012; HLATKY et al., 2002). Para a mensuração da DMV são utilizados anticorpos monoclonais direcionados aos antígenos das células endoteliais (para evidenciação dos vasos), sendo o anticorpo CD31 o mais utilizado (MARTIN et al., 1997).

O objetivo deste estudo foi pesquisar a eficácia da DMV como marcador preditivo da resposta das neoplasias mamárias caninas à quimioterapia metronômica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram avaliadas vinte (n=20) cadelas com carcinomas mamários previamente diagnosticados pela análise citológica da punção biópsia aspirativa (PBA) do(s) nódulo(s) mamário(s). A avaliação clínica desses animais foi baseada em exame físico, hemograma completo, bioquímica sérica (ureia, creatinina, ALT, AST, fosfatase alcalina, proteínas totais e albumina), urinálise, radiografias torácicas e ultra-sonografia abdominal. Todos os animais foram clinicamente estadiados pelo sistema TNM (OWEN, 1980). O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA (Unesp, Araçatuba/SP, Brasil) pelo processo FOA-00496-2013.

Grupos

Os animais foram distribuídos em dois grupos. As cadelas do grupo controle (GC) (n=10) foram submetidas ao tratamento cirúrgico, que consistiu em mastectomia em cadeia unilateral ou bilateral. As do grupo tratado (GT) (n=10) foram submetidas à quimioterapia metronômica prévia ao mesmo

tratamento cirúrgico. As cadelas do GT passaram por reavaliação clínica semanal, incluindo hemograma a cada 7 dias e bioquímica sérica a cada 14 dias. Todas as neoplasias obtidas das mastectomias passaram por avaliação histopatológica e imuno-histoquímica para CD31. A pesquisa de metástase em linfonodos satélites também foi realizada pela análise histopatológica e imuno-histoquímica com o marcador citoqueratina AE1/AE3.

Quimioterapia metronômica

O GT recebeu a QM com ciclofosfamida[a] na dose 15mg/m^2 associada ao piroxicam[b] na dose 0.3mg/kg ambos manipulados, por via oral e diariamente. Foi utilizado o omeprazol[b] na dose 0.7mg/kg como protetor de mucosa gástrica, também por via oral, em jejum e diariamente. A QM teve uma duração total de 28 dias. A toxicidade aos quimioterápicos foi graduada de acordo com os Critérios de Comum Terminologia para Efeitos Adversos do Grupo de Oncologia Veterinária (MARCHETTI et al., 2011), onde elevados graus implicam em uma pior qualidade de vida.

Histopatologia

As neoplasias mamárias e linfonodos foram clivadas e fixadas em formol tamponado a 10% no Laboratório de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), Unesp, Araçatuba. Os linfonodos regionais foram cortados segundo método para detecção de micrometástases preconizado por Weaver (2010). As amostras foram então processadas segundo os métodos de inclusão em parafina, microtomizadas com 4μm e coradas com hematoxilina e eosina (HE) (LUNA, 1968). Os cortes histológicos das neoplasias mamárias foram examinados ao microscópio de luz (Olympus DX51, Olympus, Tóquio) sendo classificadas e graduadas segundo Cassali et al. (2011).

---

[a] FarmaSíntese Oncologia Veterinária, Jaguariúna/SP, Brasil.
[b] Farmácia Apothicário, Araçatuba/SP, Brasil.

Imuno-histoquímica e Densidade Microvascular

Para as reações de imuno-histoquímica, foram obtidos cortes de 3μm de espessura. As imunomarcações anti-CD31 (Clone JC70A, Abcam, diluição 1:20) e anti-pancitoqueratina (AE1/AE3, Dako, diluição 1:300) foram realizadas pelo método polímero HRP pelo sistema de detecção comercial (Kit contendo Polímero Reveal, SPB-125, Spring), segundo as recomendações do fabricante, no Laboratório de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), Unesp, Araçatuba. As reações foram reveladas pelo sistema DAB e contra-coradas pela hematoxilina de Mayer. A DMV das neoplasias foi obtida segundo cálculo descrito por Martin et al. (1997).

Análise Estatística

Foi utilizado o teste Mann-Whitney para amostras não paramétricas com nível de significância de $p<0,05$, utilizando-se o programa computacional SAS® (Statistical Analysis System) versão 9.3. para comparação da DMV entre os grupos.

RESULTADOS

Características clínicas

A média de idade dos animais incluídos no estudo foi de 8.75 anos (5-12 anos) e, os sem raça definida foram os mais prevalentes (30%), seguidos dos da raça Poodle (25%). Em relação às variáveis que predispõem à ocorrência de neoplasia mamária em cadelas, ressaltamos que 60% delas tinham histórico de pseudociese, 25% receberam hormônios para coibir o estro e, apenas 10% delas eram ovário-histerectomizadas. As características tumorais foram diversas, sendo que 80% das neoplasias eram não aderidas e 20% aderidas; 65% apresentavam diâmetro inferior a 3,0cm, 20% com diâmetro entre 3,0 e 5,0cm e 15% maiores que 5,0cm (Figura 1A e 1B). A maioria dos tumores apresentou histórico de crescimento lento (75%) e, os demais, crescimento rápido (inferior a um mês).

FIGURA 1. Macroscopia de carcinoma mamário de cadela com 36.9 x 26.6mm de diâmetro mensurado com paquímetro digital (1A). Avaliação macroscópica de neoplasia mamária canina após mastectomia evidenciando área central de necrose (1B).

O estadiamento clínico revelou que 8(40%) dos animais estavam no estadio I, 2(10%) no estadio II, 3(15%) no estadio III, 6(30%) no estadio IV apresentando metástase nodal e 1(5%) animal no estadio V, já com metástase pulmonar. Os animais estadiados em I, II e III não apresentavam qualquer evidência de metástase.

Efeitos adversos

Os efeitos adversos observados durante o período de tratamento do grupo tratado consistiram de náusea e êmese em 6 cães com episódios leves (grau I), sem a necessidade de intervenção terapêutica. Diarreia foi observada em 2 animais (grau I) com resolução espontânea. Um animal apresentou letargia (grau I) e em dois animais foi observada alopecia (grau I). Leucopenia por linfopenia (grau I) foi identificada em um animal no curso do tratamento. Da mesma forma, a elevação sérica de ureia (grau I) de um dos casos foi revertida espontaneamente; o mesmo ocorrendo com um animal que apresentou elevação sérica de ALT (grau I), controlada com o uso de silimarina[c](30mg/kg), por via oral, uma vez ao dia até o fim do tratamento.

[c] Legalon 70mg®. Nycomed Pharma Ltda, Jaguariúna/SP, Brasil.

Histopatologia e Imuno-histoquímica

A classificação histopatológica (Figura 2A) e a frequência das neoplasias mamárias encontram-se na Tabela 1. A graduação histológica obtida se mostrou homogênea sendo que no GT, 50% dos tumores eram grau I, 20% do grau II e 30% do grau III. No GC, 40% deles eram do grau I e 60%, do grau II.

Tabela 1- Classificação[1] e frequência histopatológica das neoplasias mamárias submetidas à mastectomia com ou sem QM prévia. Araçatuba, 2014.

Tipo histológico	Grupo Controle	Grupo Tratado
Carcinoma em tumor misto	5% (1)	5% (1)
Carcinoma mamário de células escamosas	0%	10% (2)
Carcinoma micropapilar	0%	5% (1)
Carcinoma lobular invasivo	0%	5% (1)
Carcinoma tubular	35% (7)	20% (4)
Carcinoma papilar invasivo	5% (1)	5% (1)
Carcinoma sólido	5% (1)	0%

[1]Classificação segundo Cassali et al. (2011).

Nos linfonodos regionais examinados foi observada metástase de carcinoma mamário (Figura 2B e 2C) em 3 animais de cada grupo detectadas pela positividade para citoqueratina. A análise estatística (Tabela 2) mostrou diferença na densidade microvascular entre os grupos ($p<0.05$), sendo sua média no GC: 81.8 microvasos e no GT: 59.5 microvasos, evidenciando redução quantitativa na microvasculatura tumoral (Figura 2D).

Tabela 2- Média, desvio padrão (S), mediana (Md), mínimo (Min) e máximo (Max) da variável CD31.

Grupo	CD31			P[1]
	Média ± S	Md	Min – Max	
Controle	81,83 ± 20,67	72,95	61,6 – 116	0,0288
Tratado	59,57 ± 27,58	49,3	31,6 – 110	

[1]teste Mann-Whitney

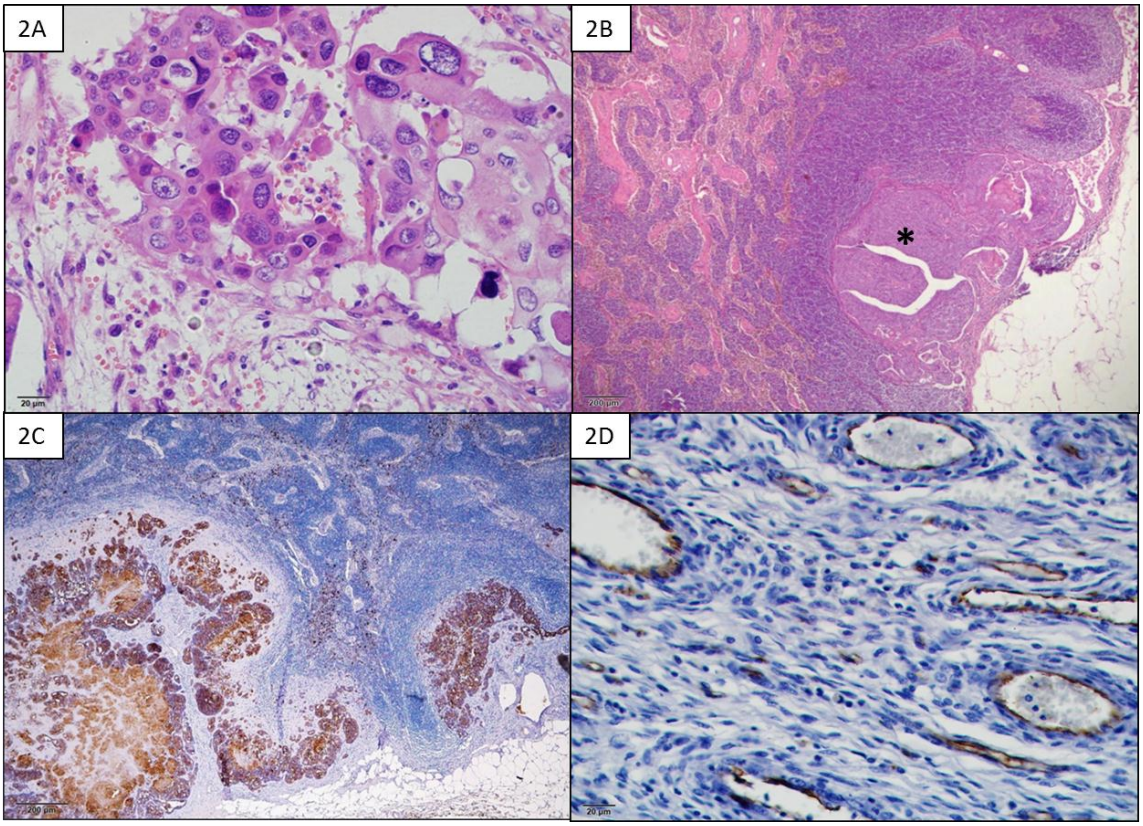


FIGURA 2.A - Carcinoma mamário de células escamosas caracterizado por alto pleomorfismo, moderado índice mitótico e queratinócitos atípicos (20x, HE). B - Fotomicroscopia de linfonodo satélite de cadeia mamária apresentando área de metástase (asterisco) de neoplasia mamária (4x, HE). C - Fotomicroscopia de imunomarcação positiva para citoqueratina AE1/AE3 evidenciando metástase em linfonodo regional de cadeia mamária (4x). D - Imunomarcação positiva para CD31 evidenciando microvasos (40x).

DISCUSSÃO

As características clínicas dos animais incluídos neste estudo caracterizam a evidência de que as NMCs são hormônio-dependentes visto que 60% das cadelas apresentaram histórico de pseudociese e 90% não eram ovário-histerectomizadas. É conhecido que, em cadelas, a OH precoce oferece um considerável efeito protetor contra o carcinoma mamário (MISDORP, 1999). Além disso, a pseudociese pode ser fator predisponente em cadelas adultas a idosas (GOBELLO et al., 2001).

A classificação histopatológica, assim como a graduação da neoplasia, são fatores prognósticos importantes. Alguns tipos histológicos de NMC requerem terapia adicional à excisão cirúrgica, como o carcinoma anaplásico, o carcinoma mamário de células escamosas e o carcinoma micropapilar, pois eles apresentam os piores prognósticos (MISDORP et al., 1999; CASSALI et al., 2011).

A terapia para a neoplasia mamária canina constitui-se, ainda, em um desafio, pois os diversos procedimentos terapêuticos atualmente descritos possuem resultados discrepantes. Dessa forma, algumas modalidades terapêuticas têm sido descritas e testadas, como os inibidores da cicloxigenase (COX), que são amplamente empregados em associação com a quimioterapia, pois há evidências do envolvimento da COX-1 e COX-2 na carcinogênese tumoral (ALKAN et al., 2012). Em linhagens celulares de neoplasias mamárias caninas utilizou-se o piroxicam que foi capaz de reduzir a proliferação celular assim como induzir apoptose dose-dependente (ALKAN et al., 2012). Portanto, inibidores não seletivos da COX, como o piroxicam, são opções terapêuticas para diferentes tipos de neoplasias em cães.

Outra modalidade terapêutica promissora para controle das NMCs constitui-se na quimioterapia metronômica, em que se utilizam diferentes fármacos quimioterápicos. A ciclofosfamida, administrada continuamente, é capaz de inibir a angiogênese, além de possuir efeito regulatório sobre a imunidade antitumoral promovendo a depleção das células T reguladoras (ELSMIE et al., 2008). A quimioterapia metronômica por longos períodos possui ainda potencial para controlar a ocorrência e o crescimento de metástases em animais de avançado estadio clínico, dada a sua segurança e mínimos efeitos adversos (ELSMIE et al., 2008).

A toxicidade observada nos animais tratados com QM foi discreta, sendo que o sinal clínico mais comum foi de êmese e, que persistiu nos três primeiros dias de tratamento, podendo ser controlada apenas com o uso de protetor gástrico. Nenhum animal necessitou de qualquer outro tipo de intervenção medicamentosa para controle deste sinal clínico. A alopecia foi observada em

apenas dois animais e foi considerada, subjetivamente, como de grau I, pois foi observado apenas um aumento na queda de pelos e rarefação pilosa. Pode-se inferir que os demais efeitos adversos observados foram isolados, não sendo possível afirmar que os mesmos estiveram relacionados à QM. A cistite hemorrágica estéril comumente relatada com o uso da ciclofosfamida não foi observada neste estudo, porém o período de tratamento realizado foi considerado curto (CHARNEY et al., 2003).

Foi demonstrada, anteriormente, correlação entre angiogênese e densidade microvascular associando-se altos escores de DMV com metástases e pior prognóstico (JAKAB et al., 2008). Neste estudo, foi proposto o uso da DMV como fator preditivo à resposta dos carcinomas mamários caninos à quimioterapia metronômica. Um marcador preditivo é aquele capaz de predizer a resposta de um paciente a um determinado tipo de terapia (SCHMITT et al., 1998). A redução quantitativa de microvasos obtida no grupo tratado foi significativa demonstrando que existe uma resposta positiva no controle da microvasculatura de carcinomas mamários de cadelas com o uso da terapia metronômica, nas condições adotadas.

No grupo de animais tratados, foi observada reduzida DMV comparando-se ao grupo controle, com exceção do que fora observado em dois animais que mantiveram altos escores de DMV (61 e 110 microvasos/campo de 200x). Porém, a média neste grupo (GT) foi de 59.5 microvasos/campo de 200x. Ressalta-se que estes dois animais foram estadiados clinicamente em estadio IV e apresentavam metástase nodal. Ainda, as pacientes eram portadoras de tumores cuja classificação histopatológica apontaram ocorrência de carcinoma de células escamosas grau II e III, respectivamente. Além disso, não houve a ocorrência deste tipo histológico no grupo controle e não há informações na literatura sobre a DMV desta neoplasia. Isto sugere que caso estes dois animais não estivessem no grupo tratado, provavelmente a DMV média do GT seria ainda menor. No entanto, outros estudos empregando um número maior de amostras de carcinomas mamários de células escamosas devem ser realizados, a fim de se concluir a eficácia da QM neste tipo histológico.

Os carcinomas em tumor misto foram os que obtiveram menores DMVs, tanto no grupo tratado quanto no grupo controle. Esta observação provavelmente pode ter ocorrido devido ao baixo grau da neoplasia ou à baixa malignidade deste subtipo histopatológico.

CONCLUSÕES

O menor valor da microvasculatura tumoral dos carcinomas mamários caninos foi devido à quimioterapia metronômica nas condições aqui adotadas. Admite-se, que a DMV pode vir a ser utilizada como fator preditivo nesta modalidade terapêutica.

É possível inferir que a QM surge na medicina veterinária como uma possibilidade terapêutica na oncologia, podendo vir a ser utilizada no controle do crescimento de carcinomas mamários caninos e suas metástases em decorrência de sua ação inibitória na angiogênese tumoral.

REFERÊNCIAS

ALKAN, F.U.; USTUNER, O.; BAKIREL, T.; MAR, S.C.; ERTEN, G.; DENIZ, G. The effects of Piroxicam and Deracoxib on Canine Mammary Tumor Cell Line. **Scient. World J.,** 2012. doi:10.1100/2012/976740.

ARNES, J.B.; STEFANSSON, I.M.; STRAUME, O.; BAAK, J.P.; LONNING, P.E.; FOULKES, W.D.; AKSLEN, L.A. Vascular proliferation is a prognostic factor in breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.,** v.133, p.501–510, 2012.

BERTOLINI, F.; PAUL, S.; MANCUSO, P. Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and

viability of circulating endothelial progenitor cells. **Cancer Res.,** v. 63, p. 4342-4346, 2003.

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

BRODEY, R.S.; GOLDSCHMIDT, M.A.; ROSZEL, J.R. Canine mammary gland neoplasms. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.,** v.19, p.61-90, 1983.

BROWDER, T., BUTTERFIELD, C. E., KRALING, B. M.; MARSHALL, B.; O'REILLY, M. S.; FOLKMAN, J. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. **Cancer Res.** v. 60, p.1878–1886, 2000.

CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; ANDRIGO, B.N. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Braz. J. Vet. Pathol.,** v.4, n.2, p.153-180, 2011.

CHARNEY, S.C.; BERGMAN, P.J.; HOHENHAUS, A.E.; MCKNIGHT, J.A. Risk factors for sterile hemorrhagic cystitis in dogs with lymphoma receiving cyclophosphamide with or without concurrent administration of furosemide: 216 cases (1990-1996). **J. Am. Vet. Med. Assoc.,** v.222(10), p.1388-1393, 2003.

EGENVALL, A.; BONNETT, B.N.; OHAGEN, P.; OLSON, P.; HEDHAMMAR, A.; VON EULER, H. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. **Prev. Vet. Med.,** v.69, p.109–127, 2005.

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

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

GOBELLO, C. De LA SOTA, R.L.; GOYA, R.G. A review of canine pseudocyesis. **Reprod Domest Anim.** V.36(6), p.283-288, 2001.

HLATKY, L.; HAHNFELDT, P.; FOLKMAN, J. Clincal application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn´t tell us. **J. Nat. Cancer Instit.,** v.94, n.12, p.883-893, 2002.

JAKAB, C.; HALÁSZ, J.; KISS, A.; SCHAFF, Z.; SZÁSZ, A.M.; RUSVAI, M.; ABONYI, T.; KULKA, J. Evaluation of microvessel density (MVD) in canine mammary tumours by quantitative immunohistochemistry of the claudin-5 molecule. **Acta Vet. Hung.** v.56, n.4, p.495-510, 2008.

LUNA, L. G. Rotine staining procedures. In: LUNA, L. G. (eds) **Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology.** New York: McGrae-Hill Book, 1968, Cap. 4 p.32-46.

MARCHETTI, V.; GIORGI, M.; FIORAVANTI, A.; FINOTELLO, R.; CITI, S.; CANU, B.; ORLANDI, P.; Di DESIDERO, T.; DANESI, R.; BOCCI, G. First-line metronomic chemotherapy in a metastatic model of spontaneous canine tumours: a pilot study. **Invest. New Drugs.,** v.30, n.4, p.1725-1730, 2012.

MARSON, L.P.; KURIAN, K.M.; MILLER, W.R.; DIXON, J.M. The effect of tamoxifen on breast tumour vascularity. **Breast Cancer Res. Treat.,** v.66, p.9–15, 2001.

MARTIN, L.; GREEN, B.; RENSHAW, C.; LOWE, D.; RUDLAND, P.; LEINSTERL, S.J.; WINSTANLEY, J. Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. **Br. J. Cancer.,** v.76, n.8, p.1046-1054, 1997.

MISDORP W.; ELSE RW.; HELLMÉN E.; LIPSCOMB E. Definitions and explanatory notes. In: WHO. **Histological classification of mammary tumors of the dog and cat.** Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999. p.18-27.

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

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

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

SCHMITT, F.C.; SOARES, R.; CIRNES, L.; SERUCA, R. P53 in breast carcinomas: association between presence of mutation and immunohistochemical expression using a semiquantitative approach. **Pathol. Res. Pract**., v.194, n.12, p.815-819, 1998.

STRAW, R.C. **Treatment of mammary gland tumors and perianal neoplasia.** Orlando: The North American Veterinary Conference (NAVC), 2005.

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

CAPÍTULO 3 – Quimioterapia metronômica induz efeitos antiangiogênicos e pró-apoptóticos em carcinomas mamários de cadelas.

Quimioterapia metronômica induz efeitos antiangiogênicos e pró-apoptóticos em carcinomas mamários de cadelas

RESUMO - A terapia para o carcinoma mamário canino (CMC) permanece um desafio em oncologia veterinária. A quimioterapia metronômica (QM) é uma opção terapêutica para neoplasias em cães e não existem resultados sobre a resposta dos CMCs a esta modalidade terapêutica. Neste estudo, foram avaliados os efeitos da QM nos carcinomas mamários de cadelas. Foram utilizadas 28 cadelas com carcinomas mamários, clinicamente estadiadas, distribuídas em dois grupos: controle (GC), submetido somente à mastectomia e tratado (GT), associando-se QM (ciclofosfamida e piroxicam, durante 28 dias) com mastectomia. As neoplasias mamárias foram classificadas e graduadas. A pesquisa de metástase de CMC em linfonodos satélites foi efetuada por imunomarcação com citoqueratina. A resposta à QM foi avaliada pela densidade microvascular (DMV), grau do VEGF tecidual, índice apoptótico (IA) e índice de proliferação celular (IP) por imunomarcações com CD31, VEGF, Caspase-3 e Ki67, respectivamente. Avaliação das amostras de tecidos mamários mostrou redução na DMV e no IA do GT, evidenciando diminuição na microvasculatura tumoral e aumento da apoptose das células tumorais quando comparado com o GC ($p<0,05$) e sem diferenças entre os grupos quando se avalia IP e VEGF tecidual. Com estes resultados é possível afirmar que a QM é capaz de diminuir a DMV e aumentar o IA dos CMCs, se tornando uma importante opção terapêutica para o tratamento e controle destas neoplasias.

Palavras-chave: angiogênese tumoral, apoptose, cães, ciclofosfamida, densidade microvascular, neoplasias mamárias.

INTRODUÇÃO

A neoplasia mamária canina (NMC) é a neoplasia mais frequente observada em cadelas não castradas e apesar de sua frequência, o tratamento para NMC permanece um desafio na medicina veterinária. Atualmente, a cirurgia é a técnica de escolha para as cadelas com neoplasias mamárias, sendo escassos os trabalhos com outros tipos de terapias (MISDORP, 2002). A terapia para o câncer de mama na mulher evoluiu significativamente na última década, desenvolvendo terapias-alvo com novas drogas além de terapias com drogas tradicionais, mas com novo esquema de utilização como a quimioterapia metronômica (QM) (ROMITI et al., 2013).

A QM ou antiangiogênica consiste no emprego de quimioterápicos em um esquema de administração frequente, sem intervalos e com baixas doses (BROWDER et al., 2000; MUTSAERS, 2009). Foi demonstrado que a QM possui efeitos antiangiogênicos devido à ausência de intervalos entre as doses, pois as células endoteliais progenitoras ficam sensibilizadas ao esquema metronômico pela inibição de sua mobilização (ELSMIE et al., 2008).

Angiogênese tumoral é a formação de novos vasos intra e peritumorais a partir de vasos pré-existentes (QUEIROGA et al., 2011; SLEECKX et al., 2014). Para o crescimento de neoplasias sólidas, angiogênese e linfangiogênse são induzidas pela neoplasia por serem essenciais para o crescimento, invasão e metástase tumoral (SLEECKX et al., 2014).

A neoplasia mamária invasiva ou *in situ* expressa diversos fatores angiogênicos, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é uma glicoproteína produzida por células normais e neoplásicas. O VEGF desempenha importante função como regulador da angiogênese fisiológica, patológica e esta presente em todos os estágios tumorais (COLLEONI et al., 2002; GIOVANINI et al., 2010; YAMASHITA-KASHIMA et al., 2012). A expressão tecidual deste fator de crescimento nas neoplasias mamárias malignas está aumentada e se relaciona com pior prognóstico e menor

sobrevida em pacientes humanos (RODRIGUES et al., 2012; YAMASHITA-KASHIMA et al., 2012).

A quantificação de aspectos da vasculatura tumoral como a densidade microvascular (DMV) é utilizada como fator prognóstico no câncer de mama da mulher (ARNES et al., 2012). A DMV revela o grau da atividade da neoformação vascular, o que pode ser usado como um marcador da eficácia dos agentes antiangiogênicos, e também eleger os pacientes candidatos à quimioterapia (HLATKY et al., 2002; BIESAGA et al., 2012). Para a mensuração da DMV, anticorpos monoclonais que se ligam aos antígenos das células endoteliais são utilizados para visualização dos vasos. O anticorpo mais utilizado para a evidenciação microvascular é o CD31 (MARTIN et al., 1997).

Na NMC a quantificação da angiogênese tumoral demonstrou uma correlação entre aumento da DMV e malignidade, relacionando-se também com o tipo e grau histológico da neoplasia (RESTUCCI et al., 2000). Em cães foi estudada a correlação da DMV intratumoral e peritumoral, demonstrando similaridades com o câncer de mama na mulher. Chama atenção, no cão, a maior DMV em neoplasias malignas quando comparada com benignas (SLEECKX et al., 2014). Neste estudo, pesquisou-se a resposta de carcinomas mamários de cadelas à quimioterapia metronômica pela avaliação da angiogênese tumoral, apoptose e proliferação de células tumorais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas vinte e oito (n=28) cadelas com carcinomas mamários previamente diagnosticados pela análise citológica da punção biópsia aspirativa (PBA) do(s) nódulo(s) mamário(s). A avaliação clínica desses animais foi baseada em exame físico, perfil hematológico, bioquímica sérica (ureia, creatinina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase,

fosfatase alcalina, proteína e albumina), urinálise, radiografias torácicas e ultra-sonografia abdominal. Todos os animais foram estadiados clinicamente pelo sistema TNM (OWEN, 1980). A experimentação animal foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA (Unesp-Araçatuba/SP, Brasil) pelo processo FOA-00496-2013.

Grupos

As cadelas foram distribuídas em dois grupos. O grupo controle (GC) (n=14) foi submetido à mastectomia em cadeia unilateral ou bilateral como terapia. O grupo tratado (GT) (n=14) foi submetido à quimioterapia metronômica seguida de mastectomia. As cadelas do GT passaram por reavaliação clínica semanal, incluindo avaliação hematológica a cada 7 dias e bioquímica a cada 14 dias. Todas as neoplasias após a mastectomia passaram por avaliação histopatológica e imuno-histoquímica.

Quimioterapia metronômica

O GT recebeu QM com ciclofosfamida[a] na dose 15 mg/m^2 associada ao piroxicam[b] na dose 0.3 mg/kg, ambos manipulados, diariamente, por via oral, durante 28 dias. Como protetor de mucosa gástrica foi utilizado o omeprazol[b] na dose 0,7 mg/kg por via oral, diariamente, 1 hora antes dos demais medicamentos com o animal em jejum pela manhã. A toxicidade aos quimioterápicos foi graduada de acordo com os Critérios de Comum Terminologia para Efeitos Adversos do Grupo de Oncologia Veterinária (MARCHETTI et al., 2011), onde altos graus implicam em uma pior qualidade de vida.

Histopatologia

As neoplasias mamárias e linfonodos foram clivados e fixados em formol tamponado no Laboratório de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), Unesp, Araçatuba. Os linfonodos regionais

---

[a] FarmaSíntese Oncologia Veterinária, Jaguariúna/SP, Brasil.
[b] Farmácia Apothicário, Araçatuba/SP, Brasil.

foram cortados segundo método para detecção de micrometástases preconizado por Weaver (2010). As amostras foram processadas segundo os métodos de inclusão em parafina, microtomizadas com 4μm e coradas com hematoxilina-eosina (HE) (LUNA, 1968). Os cortes foram examinados à microscopia de luz (Olympus BX51, Olympus, Tóquio) sendo as neoplasias mamárias classificadas e graduadas segundo Cassali et al. (2011). Também foi realizada a pesquisa de metástase em linfonodos regionais através da coloração de HE.

Imuno-histoquímica

No Laboratório de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), Unesp, Araçatuba, detectou-se a imunomarcação do VEGF tecidual e graduação do mesmo segundo Maae et al. (2011). A DMV das neoplasias foi obtida com o anticorpo anti-CD31 e calculada segundo Martin et al. (1997). Células neoplásicas em apoptose foram imunomarcadas com o anticorpo anti-caspase-3 revelando o índice apoptótico (IA) como preconizado por Lipponen (1999). A detecção do índice de proliferação (IP) das células neoplásicas foi realizada pelo anticorpo anti-Ki67 segundo Dowsett et al. (2011). As metástases nodais dos carcinomas mamários foram detectadas pela imunomarcação da pancitoqueratina. O sumário dos protocolos imuno-histoquímicos estão descritos na Tabela 1.

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas pelo método polímero HRP utilizando sistema de detecção comercial (Kit contendo Polímero Reveal, SPB-125, Spring), segundo as recomendações do fabricante.

Análise Estatística

Foi utilizado o teste Mann-Whitney para amostras não paramétricas para análise do IA entre os grupos. Para análise da DMV e IP entre os grupos utilizou-se o teste t de Student para amostras paramétricas. O teste exato de Fisher foi aplicado para a variável categórica grau de VEGF tecidual. As correlações entre estadiamento, metástase, grau histológico, grau do VEGF

tecidual, DMV, IA e IP foram testadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Graphpad Prism versão 6.0. com nível de significância $p<0,05$.

Tabela 1- Sumário dos protocolos imuno-histoquímicos

Anticorpo	Células alvo	Ac Primário	Diluição	Recuperação antigênica
CD31	Células endoteliais	Monoclonal de camundongo JC70 (Abcam)	1:20	Tampão Citrato pH 6.0 (micro-ondas)
Caspase-3	Células em apoptose	Policlonal de coelho (Abcam)	1:50	Tampão Tris-Edta comTween 20 pH 9.0 (micro-ondas)
Ki67	Células em proliferação	Policlonal de coelho (Abcam)	1:100	Tampão Citrato pH 6.0 (panela de pressão)
VEGF	Céluas neoplásicas, células endoteliais[1]	Monoclonal de camundongo VG-1 (Abcam)	1:150	Tampão Citrato pH 6.0 (micro-ondas)
Citoqueratina	Células epiteliais	Monoclonal de camundongo AE1/AE3 (Dako)	1:300	Tampão Citrato pH 6.0 (micro-ondas)

[1]marcação também de macrófagos

RESULTADOS

Características clínicas

A média de idade dos animais foi de 9.35 anos (± 2.66). Os cães sem raça definida foram os mais prevalentes (35.7%), seguidos por Poodles (14.2%) e os demais de diferentes raças. Em relação às variáveis que predispõem à ocorrência de neoplasia mamária em cadelas, 53.6% tinham histórico de pseudociese, 28.6% receberam progestágenos para coibir o estro e apenas 17.8% era ovário-histerectomizada. As características neoplásicas foram diversas, sendo 75% não aderidas e 25% aderidas; 57.2% possuíam

diâmetro inferior a 3.0cm, 10.7% entre 3.0 e 5.0cm e 32.1% maiores que 5.0cm. A maioria dos CMC apresentou crescimento lento (75%) e, os demais, histórico de crescimento rápido (inferior a um mês). O estadiamento clínico categorizou 39.2% dos cães no estadio I, 7.2% estadio II, 25% estadio III e IV, este último associado à metástase nodal e os demais no estadio V com metástase pulmonar (Tabela 2).

Efeitos adversos

Os efeitos adversos observados durante o período de tratamento com QM estão representados na Tabela 2.

Tabela 2- Toxicidade observada segundo os Critérios de Comum Terminologia para Efeitos Adversos do Grupo de Oncologia Veterinária (MARCHETTI et al., 2011)

Toxicidade	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Êmese	6	8	0	0	0	0
Diarreia	12	2	0	0	0	0
Alopecia	12	2	0	0	0	0
Leucopenia	13	1	0	0	0	0
Uremia	13	1	0	0	0	0
Elevação ALT	13	0	1[c]	0	0	0

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

[c]silimarina(30mg/kg), uma vez ao dia até o fim do tratamento.

Histopatologia e Imuno-histoquímica

As classificações e graduações histológicas foram diversificadas. Metástase nodais de carcinomas mamários foram detectadas em 3 cães do GT e 4 do GC como demonstra a Tabela 3 (Figura 1).

c Legalon 70mg®. Nycomed Pharma Ltda, Jaguariúna - SP, Brasil.

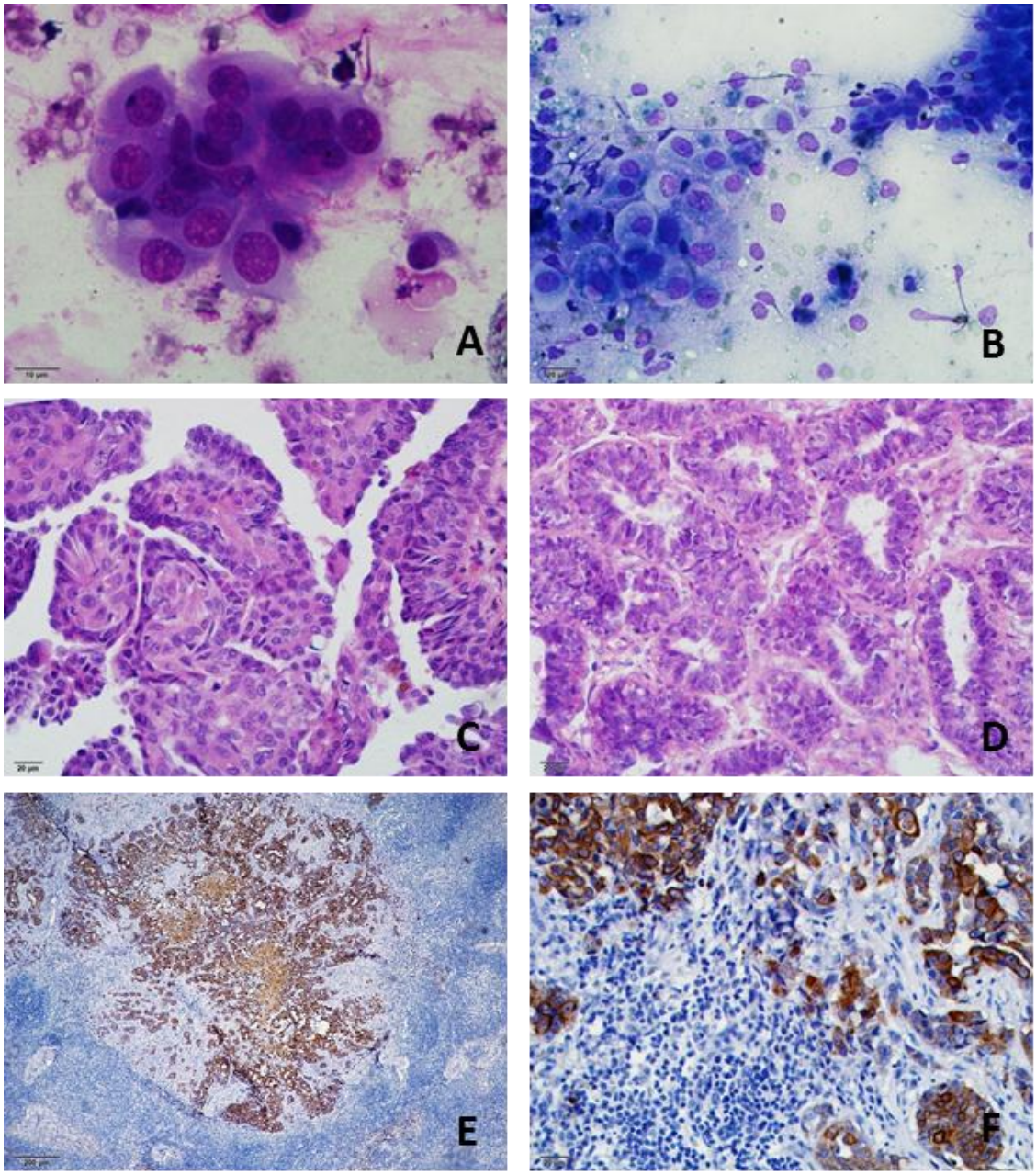


FIGURA 1- A e B – Citologia por punção biópsia aspirativa evidenciando grupo de células epiteliais com cromatina grosseira, pleomorfismo e citoplasma abundante (100x e 40x, respectivamente, Panótico). C- Carcinoma papilar de grau I apresentando grupos de células neoplásicas, com morfologia digitiforme(40x, HE). D - Fotomicroscopia de carcinoma tubular de grau II evidenciando múltiplas formações tubulares (40x, HE). E - Fotomicroscopia de imunomarcação positiva para citoqueratina AE1/AE3 exibindo metástase em linfonodo regional de cadeia mamária (4x). F – Detalhe de células epiteliais imunomarcadas por citoqueratina (40x).

A comparação da DMV entre os grupos mostrou diferença (p=0,0115), com média no GT de 60.47 ± 23.36 microvasos/campo 200x e no GC de 84.71 ± 23.57 microvasos/campo 200x (Figuras 2 e 3).

A quantificação das células imunomarcadas pela caspase-3 demonstrou que o IA foi maior no GT que no GC (GT: 64,5 ± 51.93 células/campo 400x e GC: 34,4 ± 17.18 células/campo 400x) (p=0,0483) (Figuras 2 e 3). Não houve diferença estatística entre os grupos no IP e no grau do VEGF (Figura 3).

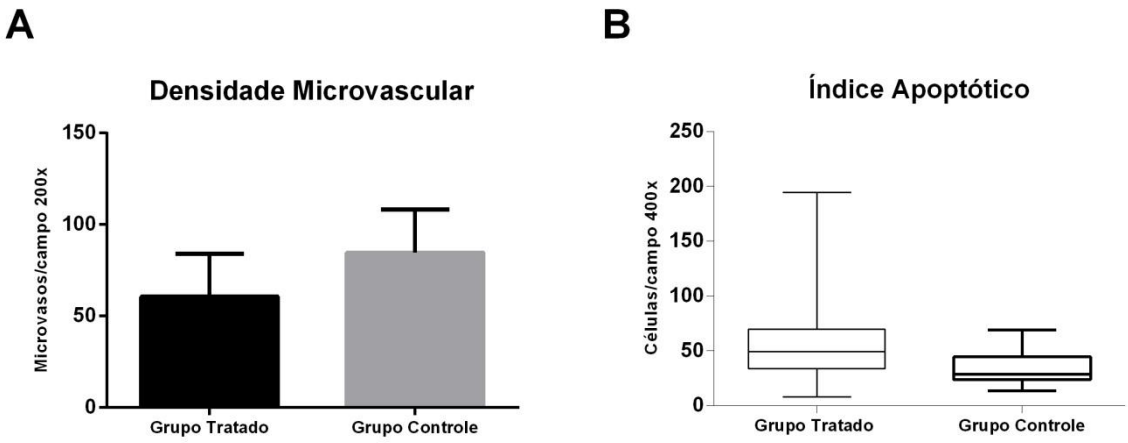


FIGURA 2 - Grupo Tratado: mastectomia associada à quimioterapia metronômica; Grupo Controle: mastectomia. **A.** Densidade microvascular dos carcinomas mamários. Observa-se diferença (p<0,05) na DMV entre os grupos, teste T de Student. **B.** Índice apoptótico dos carcinomas mamários com diferença entre os grupos, teste Mann-Whitney (p<0,05).

Segundo o coeficiente de Spearman não houve correlação entre as variáveis estadiamento, metástase, grau histológico, grau do VEGF tecidual, DMV, IA e IP em ambos os grupos.

Tabela 3- Classificação histopatológica, estadiamento clínico, Positividade para citoqueratina, grau histológico, DMV, Grau VEGF, IA e IP dos carcinomas mamários caninos divididos por grupos.

	ID	Classificação histopatológica	ET	CK	GH	DMV	GV	IA	IP
GRUPO TRATADO	1	Carcinoma mamário de células escamosas	IV	(+)	II	61	I	194.4	67
	2	Carcinoma em tumor misto	IV	(-)	II	31.6	II	44.6	70.3
	3	Carcinoma micropapilar	V	(-)	III	48.3	III	30.4	103
	4	Carcinoma tubular	I	(-)	I	35.3	III	20	30
	5	Carcinoma mamário de células escamosas	IV	(+)	III	110	III	47.6	94
	6	Carcinoma tubular	I	(-)	I	65.6	II	8.2	105
	7	Carcinoma tubular	III	(-)	I	47.3	III	66.6	32.3
	8	Carcinoma papilar invasivo	I	(-)	I	50.3	III	44.6	140
	9	Carcinoma papilar invasivo	I	(-)	I	58.6	III	64	58
	10	Carcinoma em tumor misto	III	(-)	I	85	III	50.8	47.6
	11	Carcinoma em tumor misto	I	(-)	II	42	II	79.2	26
	12	Carcinoma papilar invasivo	IV	(+)	III	88	III	35.4	121
	13	Carcinoma tubular	I	(-)	II	80	II	56.4	60.8
	14	Carcinoma tubular	I	(-)	I	40	III	162	111
GRUPO CONTROLE	1	Carcinoma tubular	IV	(+)	II	100	I	26.6	28
	2	Carcinoma tubular	IV	(+)	I	102	III	57.4	90.3
	3	Carcinoma papilar invasivo	I	(-)	I	116	III	40.4	125.6
	4	Carcinoma tubular	I	(-)	II	61.6	III	24.2	24
	5	Carcinoma em tumor misto	III	(-)	I	63.6	III	61.2	22.3
	6	Carcinoma tubular	III	(-)	II	62	III	24	42.3
	7	Carcinoma em tumor misto	IV	(+)	I	66.6	III	31	52
	8	Carcinoma tubular	I	(-)	II	67.3	III	25.8	107.6
	9	Carcinoma tubular	I	(-)	II	78.6	III	23.2	40.6
	10	Carcinoma tubular	IV	(+)	II	100.6	III	69	37.3
	11	Carcinoma tubular	III	(-)	I	127	III	14.2	56
	12	Carcinoma em tumor misto	III	(-)	II	111	II	13.8	67.6
	13	Carcinoma tubular	III	(-)	I	69	II	32	103.6
	14	Carcinoma tubular	II	(-)	I	61.3	III	38.8	38

ID- Identificação, ET- Estadiamento clínico, CK- Citoqueratina, GH- Grupo histológico, DMV- Densidade microvascular, GV- Grau VEGF, IA- Índice apoptótico, IP- Índice de proliferação celular, (+) positiva, (-) negativa.

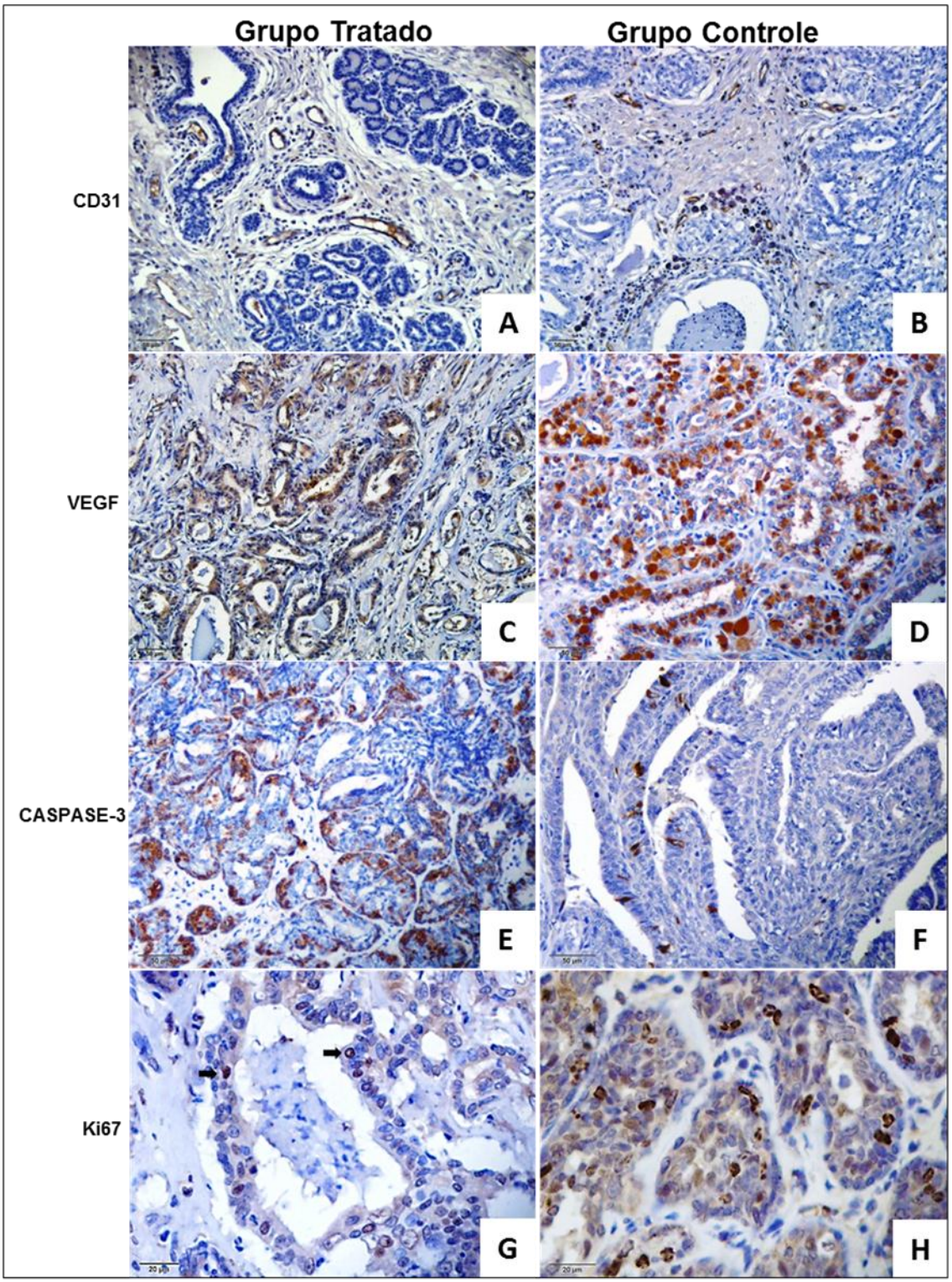


FIGURA 3- A e B - Imunomarcação positiva para CD31 evidenciando microvasos em carcinomas mamários com redução na DMV do GT quando comparado ao GC (20x). C e D - Fotomicroscopia de carcinomas mamários com diferentes graus de imunomarcação para VEGF (C- grau I; D- grau III) (20x). E e F – Células apoptóticas imunomarcadas por caspase-3, exibindo intensa marcação no GT quando comparada ao GC (20x). G e H - Proliferação de células neoplásicas apresentando marcação nuclear por Ki67 (seta) (40x).

Acompanhamento e sobrevida

Até o presente momento um animal do GT veio a óbito com sobrevida de 142 dias (paciente número 3) com metástase pulmonar e óssea. Outra cadela (número 5) do GT, com o mesmo padrão metastático do anterior, continua a ser acompanhada. Os cães número 2 e 7 do GC apresentaram metástase pulmonar e nódulo esplênico, respectivamente. A comprovação da metástase esplênica não foi realizada, pois os padrões ultra-sonográficos observados não permitiram diferenciar de hiperplasia nodular senil e neoplasia primária. Os outros animais continuam a ser acompanhados, apresentando período livre de doença entre 45 a 399 dias.

DISCUSSÃO

A quimioterapia é utilizada há décadas para o tratamento e controle de diferentes tipos de neoplasias em oncologia veterinária. Apesar da neoplasia mamária canina possuir alta incidência em diferentes regiões do mundo, pouca informação existe sobre os efeitos da quimioterapia convencional neste tipo de neoplasia. No que remete à quimioterapia metronômica não existem resultados sobre seus efeitos em carcinomas mamários caninos. Relatos demonstram que, após excisão cirúrgica, 48% dos cães morrem ou são eutanasiados dentro de um ano, devido à recidiva ou metástase tumoral de NMC (SAITO et al., 2013). A importância do presente trabalho é proporcionar nova possibilidade terapêutica para os CMCs, por serem as neoplasias mais comuns em cadelas.

A quimioterapia convencional é baseada no uso de quimioterápicos em sua dose máxima tolerável (DMT), ou seja, altas doses que requerem intervalos de tempo entre aplicações para que células sensíveis (epitélio intestinal, medula óssea, etc.) sejam capazes de se recuperar (MANINETTI et al., 2011). Os efeitos adversos após utilização da DMT, tendem a serem maiores e, tanto os proprietários de animais como os médicos veterinários, são pouco receptivos às suas consequências. Em virtude destes efeitos, as doses

utilizadas em oncologia veterinária são menores quando comparadas às utilizadas na oncologia humana (MUTSAERS, 2009).

Browder et al. (2000) e Klement et al. (2000) conceituaram, originalmente, a quimioterapia metronômica (QM) que possui propriedades antiangiogênicas mais potentes que com o uso da DMT, além de minimizar seus efeitos adversos. A toxicidade observada nos animais tratados com QM foi discreta, sendo que o sinal clínico mais comum foi êmese, que persistiu nos três primeiros dias de tratamento, controlada apenas com o uso de protetor gástrico. Alopecia ocorreu em dois animais e foi considerada, subjetivamente, como de grau I, pois foi apenas rarefação pilosa. Pode-se inferir que os demais efeitos adversos foram isolados, não sendo possível afirmar que os mesmos estiveram relacionados à QM. A cistite hemorrágica estéril comumente relatada com o uso da ciclofosfamida (CHARNEY et al., 2003) não foi diagnosticada neste estudo, porém o período de tratamento realizado foi considerado menor quando comparado com Elsmie et al. (2008).

Os quimioterápicos citotóxicos convencionais, como a ciclofosfamida, danificam diretamente o DNA celular, no seu ciclo de divisão celular, com intuito de destruir o máximo de células (BROWDER et al., 2000). Algumas drogas, possuem mecanismo de ação secundário, inibindo a angiogênese tumoral (BROWDER et al., 2000). O inconveniente da quimioterapia com uso de DMT, por uma perspectiva antiangiogênica, envolve o fato de que o intervalo de tempo entre os ciclos permite ao componente endotelial do tumor uma oportunidade de reparo (KLEMENT et al., 2000; MUTSAERS, 2009). Neste estudo, o emprego da ciclofosfamida associada ao piroxicam em doses metronômicas nos CMCs reduziu a DMV tumoral e induziu aumento do IA de células tumorais no GT, demonstrando eficácia da QM. De acordo com as observações de Hanahan et al. (2000) a associação de drogas inibidoras da cicloxigenase (COX) à QM, aumenta a indução da morte de células endotelias e de células tumorais, podendo agir também em outros constituintes tumorais por mecanismos secundários pró-apoptóticos.

Os grupos apresentaram diferentes tipos histológicos de carcinomas mamários o que promoveu diversidade na quantificação da DMV nos resultados obtidos. É comprovado que existem diferenças nas DMVs nos diferentes tipos histológicos de neoplasias mamárias em cadelas, sendo que o tecido mamário normal apresenta menor DMV do que neoplasias e neoplasias benignas apresentam menores DMVs quando comparadas às malignas (QUEIROGA et al., 2011; RESTUCCI et al., 2000; SLEECKX et al., 2014).

Adenocarcinomas papilares e tubulares caninos apresentam menores DMVs, segundo Restucci et al. (2000), quando comparadas com carcinomas mamários: sólidos, em tumor misto e de células escamosas. Além disso, existe correlação entre DMV e graduação histológica quando esta é baseada na graduação segundo Misdorp (2002) (RESTUCCI et al., 2000). O GC mostrou classificação histológica homogênea, sendo representado na sua maioria por carcinomas mamários tubulares. No entanto, no GT essa classificação foi mais heterogênea, sendo composta por carcinomas mamários: tubulares, em tumor misto, papilares invasivos, de células escamosas e micropapilares (Tabela 3). Essa variação demonstra que o GC deveria apresentar uma DMV menor quando comparada com o GT em uma perspectiva histopatológica. A DMV obtida no GT foi menor que a do GC o que reforça a redução na microvasculatura tumoral devido à quimioterapia metronômica.

Os carcinomas de células escamosas observados no GT apresentaram altas DMVs (pacientes número 1 e 5), apesar da QM. Ambos demonstraram altas graduações histológicas (graus II e III, respectivamente) e alto estadiamento clínico (ambos estadio IV) com metástases nodais detectadas. O cão número 1 continua a ser acompanhado sem detecção de metástase distante até o momento, provavelmente por ter obtido uma boa resposta ao tratamento, representada na maior quantificação do IA. A cadela número 5 continua a ser monitorada após o diagnóstico de metástase pulmonar e óssea. Contraria a observação do paciente anterior este não exibiu IA elevado. Em função desses achados, é possível inferir que ambos possuem características

malignas e certamente contribuíram para o aumento da média e do desvio padrão da DMV no GT.

Os carcinomas micropapilares possuem comportamento agressivo em cadelas, assim como em humanos. Gamba et al. (2013) caracterizou este tipo histológico e detectou metástases nodais em 100% dos casos avaliados com sobrevida média de 120 dias além de positividade para CD31 apesar de não ter obtido a DMV média. Estes achados explicam a curta sobrevida (142 dias) do paciente número 3 do GT, apesar da não detecção de metástases nodais por imunomarcação com citoqueratina.

A graduação histológica nos grupos foi diversificada, no GC os graus I e II foram igualmente prevalentes. No GT a maioria foi de grau I, seguido dos graus II e III. Não foram observadas correlações entre DMV e graduação histológica em ambos os grupos, ressaltando que o método de graduação empregado foi de Ellston & Ellis (1998). A ausência de correlação pode estar associada ao método de graduação histológica adotado. Segundo Restucci et al. (2000) carcinomas mamários de grau III usualmente apresentam maiores DMVs, reforçando a eficácia da QM em reduzir a DMV, pois na presente pesquisa no GC não haviam carcinomas de grau III quando comparado ao GT.

Apoptose, ou morte celular programada, é considerado um mecanismo celular intrínseco e regulado pelo controle entre a produção de novas células e a capacidade individual das células em se autodestruírem (DUBIN et al., 2000). O seu papel é importante na determinação do crescimento tumoral e sua agressividade. A combinação nos índices de proliferação celular e apoptose pode proporcionar perspectiva mais realista do comportamento da neoplasia (OESTERREICH et al., 2003). O início do processo apoptótico é rigidamente controlado por proteases, chamadas de caspases, que são ativadas pela clivagem proteolítica em resposta aos sinais que induzem a morte celular programada (OESTERREICH et al., 2003). O processo de apoptose é geralmente avaliado através do IA que é baseado na média de células em apoptose imunomarcadas em cada corte histológico (LIPPONEN, 1999).

A avaliação do IA foi realizada por imunomarcação com o anticorpo anti-caspase-3, demonstrando aumento significativo na apoptose das células tumorais do GT quando comparada ao GC. A provável explicação para esta observação é o efeito secundário da quimioterapia metronômica em induzir apoptose nos CMCs. No câncer de mama na mulher o IA é correlacionado com o diâmetro da neoplasia (quanto maior a neoplasia maior o IA), grau histológico (quanto maior o grau maior o IA), positividade para receptores hormonais (IA maior em neoplasias negativas) e índice de proliferação celular (correlação positiva entre as duas variáveis) (LIPPONEN, 1999).

A obtenção do IP pode ser realizada por imunomarcação com o anticorpo anti-Ki67. A proteína nuclear Ki67 encontra-se nas fases ativas do ciclo de divisão celular e sua expressão se relaciona com a replicação do DNA celular (ZUCCARI et al., 2008). O IP está correlacionado com pior prognóstico, maior risco de metástases e menor sobrevida em cadelas (PENA et al., 1998; ZUCCARI et al., 2008). Nos adenocarcinomas simples de glândula mamária de cadelas existe forte correlação positiva entre Ki67 e graduação histológica. No mesmo estudo, houve moderada correlação entre IP e VEGF e entre grau histológico e VEGF (Al-DISSI et al., 2010). No presente trabalho não houve correlação entre IP e: IA, presença de metástase nodal, estadiamento clínico e grau histológico. Esta não correlação pode ser devido à diversidade na classificação e graduação histopatológica dos grupos ou ainda pelo método de graduação empregado. Além disso, não houve diferença no IP entre o grupo tratado e controle o que, além de poder estar relacionado com a natureza histológica das neoplasias, também se relaciona com o curto período de tratamento realizado.

VEGF é uma proteína que possui um papel central na angiogênese tumoral e está presente no tumor e nas regiões peri-tumorais das neoplasias mamárias caninas (MILLANTA et al., 2006; SLEECKX et al., 2014). Esta proteína é capaz de estimular a proliferação, migração de células endoteliais, prevenir regressão de novos vasos, aumentar permeabilidade vascular, além de ser um fator de sobrevivência que previne a apoptose das células

endoteliais (HANAHAN et al., 2000; QUEIROGA et al., 2011). A expressão do VEGF tecidual é mais evidente nas neoplasias mamárias malignas quando comparada com as benignas em cadelas (QUEIROGA et al., 2011).

Neste estudo não houve diferença entre os grupos em relação ao grau do VEGF tecidual dos carcinomas mamários pela diversidade histopatológica, tanto na classificação quanto na graduação, e também pela metodologia para detecção do VEGF utilizada. Maae et al. (2011) pesquisaram diferentes metodologias para quantificar o VEGF tecidual através da imuno-histoquímica e demonstraram que variações na quantificação da expressão do VEGF podem ocorrer na mesma massa tumoral. Por este motivo, o VEGF tecidual não seria um bom marcador prognóstico. A expressão do VEGF pode ainda ser detectada sorologicamente ou por técnicas moleculares como a PCR, sendo estas técnicas menos susceptíveis às variáveis teciduais, apesar de haverem trabalhos divergentes sobre o real significado deste fator (BREMNES et al., 2006; MANIETTI et al., 2011).

CONCLUSÕES

A quimioterapia metronômica com ciclofosfamida e piroxicam possui efeitos benéficos no tratamento dos carcinomas mamários caninos, reduzindo a microvasculatura tumoral e aumentando o índice apoptótico das células neoplásicas. Os resultados obtidos tornam esta modalidade de quimioterapia uma opção viável para o tratamento dos CMCs, por apresentar como vantagens: efeitos colaterais escassos, baixo custo e comodidade em sua utilização.

REFERÊNCIAS

AL-DISSI, A.N.; HAINES, D.M.; SINGH, B.; KIDNEY, B.A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. **Can. Vet. J.,** v.51, p.1109-1114, 2010.

ARNES, J.B.; STEFANSSON, I.M.; STRAUME, O.; BAAK, J.P.; LONNING, P.E.; FOULKES, W.D.; AKSLEN, L.A. Vascular proliferation is a prognostic factor in breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.,** v.133, p.501–510, 2012.

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

BREMNES, R.M.; CAMPS, C.; SIRERA, R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: The prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. **Lung Cancer.,** v.51, p.143—158, 2006.

BROWDER, T., BUTTERFIELD, C. E., KRALING, B. M., MARSHALL, B., O'REILLY, M. S.; FOLKMAN, J. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. **Cancer Res.,** v. 60, p.1878–1886, 2000.

CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; ANDRIGO, B.N. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Braz. J. Vet. Pathol.,** v.4, n.2, p.153-180, 2011.

CHARNEY, S.C.; BERGMAN, P.J.; HOHENHAUS, A.E.; MCKNIGHT, J.A. Risk factors for sterile hemorrhagic cystitis in dogs with lymphoma receiving

cyclophosphamide with or without concurrent administration of furosemide: 216 cases (1990-1996). **J. Am. Vet. Med. Assoc.,** v.222, n.10, p.1388-1393, 2003.

COLLEONI, M.; ROCCA, A.; SANDRI, M.T.; ZORZINO, L.; MASCI, G.; NOLÈ, F.; PERUZZOTTI, G.; ROBERTSON, C.; ORLANDO, L.; CINIERI, S.; De BRAUD, F.; VIALE, G.; GOLDHIRSCH, A. Low-dose oral methotrexate and cyclophosphamide in metastatic breast cancer: antitumor activity and correlation with vascular endothelial growth factor levels. **Ann. Oncology.,** v.13, p.73-80, 2002.

DOWSETT, M.; NIELSEN, T.O.; A'HERN R. et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. **J. Natl. Cancer Inst.,** v.103, n.22, p. 1656-1664, 2011.

DUBIN, M.; STOPPANI, A.O.M. Muerte celular programada y apoptosis funcion de las mitocondrias. **Medicina** (Buenos Aires). v. 60, p. 375-386, 2000.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Assessment of histological grade. In: ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. **Systemic pathology:** the breast. London: Churchill Livingstone, 1998. p.365-384.

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

GAMBA, C.O.; DIAS, E.J.; RIBEIRO, L.G.R.; CAMPOS, L.C.; ESTRELA-LIMA, A.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Histopathological and immunohistochemical assessment of invasive micropapillary mammary carcinoma in dogs: A retrospective study. **Vet. J**., v.196, p.241–246, 2013.

GIOVANNINI, M.; ALDRIGHETTI, D.; ZUCCHINELLI, P.; BELLI, C.; VILLA, E. Antiangiogenic strategies in breast cancer management. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.,** v.76, p.13–35, 2010.

HANAHAN, D.; BERGERS, G.; BERGSLAND, E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. **J. Clin. Invest.,** v.105, n.8, p. 1045-1047, 2000.

HLATKY, L.; HAHNFELDT, P.; FOLKMAN, J. Clincal application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn´t tell us. **J. Nat. Cancer Instit.,** v.94, n.12, p.883-893, 2002.

KLEMENT, G.; BARUCHEL, S.; RAK, J.; MAN, S.; CLARK, K.; HICKLIN, D.J.; BOHLEN, P.; KERBELL, R.S. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. **J. Clin. Invest.,** v.105, n.8, p.15-24, 2000.

LIPPONEN, P. Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. **End. Rel. Cancer.,** v.6, p.13-16, 1999.

LUNA, L. G. Rotine staining procedures. In: LUNA, L. G. (eds) **Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology.** New York: McGrae-Hill Book, 1968, Cap. 4 p.32-46.

MAAE, E.; NIELSEN, M.; STEFFENSEN, K.D.; JAKOBSEN, E.H.; JAKOBSEN, A.; SORENSEN, F.B. Estimation of Immunohistochemical Expression of VEGF in Ductal Carcinomas of the Breast. **J. Histoch, Cytoch.,** v.59, n.8, p.750-760, 2011.

MAINETTI, L.E.; ROZADOS, V.R.; ROSSA, A. et al. Antitumoral and antimetastatic effects of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide

combined with celecoxib on murine mammary adenocarcinomas. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.,** v.137, p.151–163, 2011.

MARCHETTI, V.; GIORGI, M.; FIORAVANTI, A.; FINOTELLO, R.; CITI, S.; CANU, B.; ORLANDI, P.; Di DESIDERO, T.; DANESI, R.; BOCCI, G. First-line metronomic chemotherapy in a metastatic model of spontaneous canine tumours: a pilot study. **Invest. New Drugs.,** v.30, n.4, p.1725-1730, 2012.

MARTIN, L.; GREEN, B.; RENSHAW, C.; LOWE, D.; RUDLAND, P.; LEINSTERL, S.J.; WINSTANLEY, J. Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. **Br. J. Cancer.,** v.76, n.8, p.1046-1054, 1997.

MILLANTA, F.; SILVESTRI, G.; VASELLI, C.; CITI, S.; PISANI, G; LORENZI, D.; POLI, A. The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: A preliminary study of autocrine and paracrine loops . **Res. Vet. Sci.,** v.81, p.350– 357, 2006.

MISDORP W.; ELSE RW.; HELLMÉN E.; LIPSCOMB E. Definitions and explanatory notes. In: WHO. **Histological classification of mammary tumors of the dog and cat.** Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999. p.18-27.

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

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

OESTERREICH, S.; DENG, W.; JIANG, S. et al. Estrogen-mediated down-regulation of E-cadherin in breastcancer cells. **Cancer Res.**, v.63, p.5203-5208, 2003.

OWEN, L.N. Classification of tumors in domestic animals. In: **World Health Organization.** 1ed. Geneva, Switzerland: WHO, 1980. p. 26-32.

PENA L.L., NIETO A.I., PEREZ-ALENZA D.; CUESTA P.; CASTANO M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. **J. Vet. Diagn. Invest.,** v.10, n.3, p.237-246, 1998.

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

RESTUCCI, B.; De VICO, G; MAIOLINO, P. Evaluation of angiogenesis in canine mammary tumors by quantitative platelet endothelial cell adhesion molec ule immunohistochemistry. **Vet Pathol.,** v.37, n.4, p.297-301, 2000.

RODRIGUES, P.; FURRIOL, J.; TORMO, E.; BALLESTER, S.; LLUCH, A.; EROLES, P. The single-nucleotide polymorphisms +936 C/T VEGF and 2710 C/T VEGFR1 are associated with breast cancer protection in a Spanish population. **Breast Cancer Res. Treat.,** v.133, n.2, p.769-778, 2012.

ROMITI, A.; COX, M.C.; SARCINA, I.; DI ROCCO, R.; D'ANTONIO, C.; BARUCCA, V.; MARCHETTI, P. Metronomic chemotherapy for cancer treatment: a decade of clinical studies. **Cancer Chem. Pharmacol.,** v.72, n.1, p.13-33, 2013.

SAITO, T.; TAMURA, D.; NAKAMURA, T. et al. 4-Methylumbelliferone leads to growth arrest and apoptosis in canine mammary tumor cells. **Oncol. Rep.,** v.29 p.335-342, 2013.

SLEECKX, N.; VAN BRANTEGEM, L.; VAN DEN EYNDEN, G. et al. Angiogenesis in Canine Mammary Tumours: A Morphometric and Prognostic Study. **J. Comp. Path.,** v. 150, p.175-183, 2014.

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

YAMASHITA-KASHIMA, Y.; FUJIMOTO-OUCHI, K.; YOROZU, K.; KURASAWA, M.; YANAGISAWA, M.; YASUNO, H.; MORI, K. Biomarkers for antitumor activity of bevacizumab in gastric cancer models. **BMC Cancer.,** v.12, n.37, p.1-12, 2012.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A - FICHA DE TUMORES DE MAMA EM CADELAS

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

I) FORMULÁRIO GERAL DE AVALIAÇÃO

1. Ciclo Estral: ( )Regular ( )Irregular ( )Não apresenta ( )NSI
2. N° de Gestações: ( )Ausente ( )Uma ( )Outros valores:_____ ( )NSI
3. Pseudogestação: ( )Sim (Frequência:_____) ( ) Não
4. Abortos: ( )Sim ( )Não
5. Castração: ( )Sim (Data:) ( )Não

( )Eletiva ( )Pseudociese ( )Tumor de mama ( )Cesariana ( )Piometra ( )NSI

6. Alterações Uterinas (secreção)/Quando?: ( )Sim_____ ( )Não
7. Cruzamentos sem prenhez: ( )Sim ( )Não
8. Uso de hormônios: ( )Anticoncepcionais ( )Abortivos ( )Não

(Tipo:_____) (Frequência:_____)

9. Efeitos colaterais (pós-hormônio): ( )Sim ( )Não
10. Tumores prévios: ( )Sim ( )Mama ( )Outros

(Localização:_____)

(Evolução:_____)

(Cirurgia:_____) (Recidivas:_____)

11. Tipo de Dieta: ( )Caseira ( )Ração ( )Outros_____
12. Tipo de Água: ( )Mineral ( )Torneira ( )Poço Artesiano
13. Outras Observações:

*NSI: não sabe informar

II) FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

1. Histórico do animal/Evolução:

2. Diâmetro Máximo do(s) Tumor(ES):

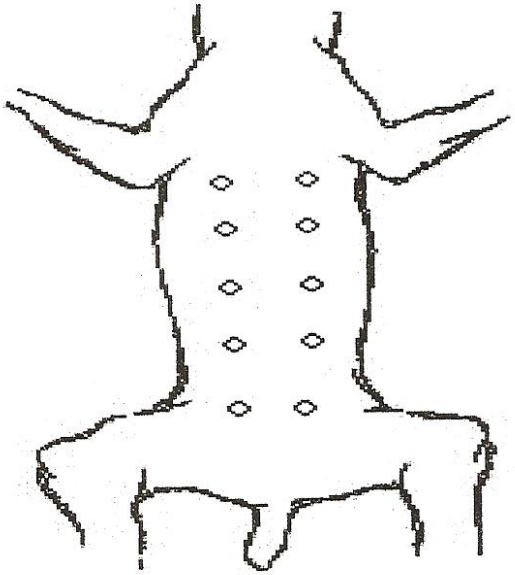
( )Menor que 3cm ( )3-5cm ( )Maior que 5cm ( )Outros: _____

Descrição/Localização:_____

_____

_____

_____



3. Invasão de gânglios linfáticos à palpação:

( )Não evidente ( )Evidente. Onde?_____

Confirmada com resultado histo ou citopatológico: ( )Sim ( )Não

4. Metástases à Distância:

( )Ausente ( )Presente. Onde?_____

5. Crescimento Tumoral:

( )Lento – Tempo aproximado:_____ ( )Rápido – Tempo aproximado:_____

6. Ulceração:

( )Ausente ( )Presente. Onde?_____ Tempo aproximado:_____

7. Presente de contaminação: ( )Sim ( )Não

8. Quanto à infiltração de nódulo (s): ( )Pedunculado ( )Aderido Onde:_____

III) SISTEMA TNM (TUMOR/NÓDULO/METÁSTASE)

T: diâmetro máximo do tumor

T_1: < 3cm de diâmetro

T_2: 3-5cm de diâmetro

T_3: > 5cm de diâmetro

N: envolvimento de linfonodos regionais

N_0: ausência de metástases (cito ou histopatológico)

N_1: presença de metástases (cito ou histopatológico)

M: presença de metástases à distância

M_0: ausência de metástases

M_1: presença de metástases à distância

ESTÁDIO	*T*	*N*	*M*
I	T_1	N_0	M_0
II	T_2	N_0	M_0
III	T_3	N_0	M_0
IV	Qualquer	N_1	M_0
V	Qualquer	Qualquer	M_1

ESTADIO: _____