

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

**“Avaliação do efeito do propranolol como bloqueador
simpático em cadelas com neoplasias mamárias”**

**Murillo Daparé Kirnew
Médico Veterinário**

2019

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

**“Avaliação do efeito do propranolol como bloqueador
simpático em cadelas com neoplasias mamárias”**

Murillo Daparé Kirnew

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP,
Campus de Jaboticabal, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Medicina Veterinária. Área:
Clínica Médica Veterinária.**

K59a Kirnew, Murillo Daparé
Avaliação do efeito do propranolol como bloqueador simpático em
cadelas com neoplasias mamárias / Murillo Daparé Kirnew. --
Jaboticabal, 2019
41 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Aparecido Antonio Camacho

1. via anti-inflamatória colinérgica. 2. adrenoreceptores. 3.
anticancer. 4. betabloqueadores. 5. inflamação crônica. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PROPRANOLOL, COMO BLOQUEADOR SIMPÁTICO EM CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS

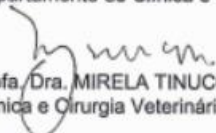
AUTOR: MURILLO DAPARÉ KIRNEW

ORIENTADOR: APARECIDO ANTONIO CAMACHO

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



Prof. Dr. APARECIDO ANTONIO CAMACHO
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA
Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV - UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. FÁBIO NELSON GAVA
Centro Universitário Central Paulista-UNICEP / São Carlos/SP

Jaboticabal, 08 de março de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Murillo Daparé Kirnew – nascido aos 19 de Dezembro de 1989, filho de Eduardo Montechesi Kirnew e Selma de Fátima Daparé Kirnew, brasileiro e natural de Ourinhos. Iniciou sua graduação em Março de 2009 na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça – FAMED. Em 2012 transferiu o curso para a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) UNESP – campus de Jaboticabal, concluindo-a em dezembro de 2014. Entre 2013 e 2014 desenvolveu projeto de iniciação científica com bolsa FAPESP, sob orientação do Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho. No período de 1º março de 2015 a 28 de fevereiro 2017 foi residente do Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária e Saúde Pública, da mesma instituição, na área de Clínica Médica de Pequenos Animais, sob orientação do Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho. Em 2017, ingressou no mestrado na FCAV UNESP, no programa Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária) com ênfase em Cardiologia Veterinária e sob orientação do Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho.

EPÍGRAFE

"Aprendi que vai demorar muito para me transformar na pessoa que quero ser, e devo ter paciência. Mas, aprendi também, que posso ir além dos limites que eu próprio coloquei."

(Charles Chaplin)

DEDICATÓRIA

A todos que me acrescentaram experiência profissional durante este período de maestria

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela saúde, e pela oportunidade de sempre buscar meus sonhos;

Aos meus pais Eduardo e Selma, por todo amor, carinho, incentivo e confiança, sem nunca medirem esforços para estudar eu e minha irmã;

A toda minha família, em especial ao meu querido e amado vô Galeno, pelo carinho, pelo apoio, pelo incentivo e pela torcida;

Ao meu orientador e pai científico, Professor Dr. Aparecido Antonio Camacho, pela oportunidade, pela confiança, pelo aprendizado, pelo companheirismo, por toda atenção e paciência durante estes anos, ainda pela orientação da iniciação científica, pela orientação do aprimoramento e agora pela orientação do mestrado e do doutorado;

Aos professores e estimados amigos Pedro Paulo Maia Teixeira e Regina Mendes Medeiros, pela oportunidade e confiança, sem o incentivo deles eu não estaria nessa instituição;

Ao amigo Fernando Azadinho Rosa pela confiança e pelo aprendizado durante o trabalho executado no seu estudo de Doutorado.

Ao Professor Dr. Sergio Britto Garcia, por toda conversa e direcionamento do trabalho, por toda disposição em colaborar com os nossos resultados futuros.

Às residentes do serviço de Obstetrícia e Reprodução Animal, pelos casos encaminhados ao estudo;

Aos amigos do Serviço de Cardiologia: Matheus, Roberto, Alejandro, Raphaela, Jaislane e Tamyris pela ajuda durante a execução deste trabalho;

À Marjury pela disposição e realização dos exames ultrassonográficos;

Ao Igor e à querida Professora Mirela pelo apoio financeiro para a realização dos exames laboratoriais;

Aos funcionários e residentes do laboratório de Patologia Clínica, pela ajuda na realização dos exames laboratoriais;

Às empresas CEVA, Premier, MSD e Ourofino pelos brindes destinados aos proprietários que aderiram ao projeto;

A todos os professores com os quais tive ensejo de aprender e evoluir, da pré-escola até meu presente dia. Vocês são a inspiração e a esperança de um futuro menos desigual;

A minha segunda família: República Antro do HV, na qual moro há 7 anos. Aos ex-moradores, aos atuais e aos estagiários. Vocês fazem a diferença, não me imagino sem a convivência e amizade de vocês;

Aos amigos que tive o prazer de conhecer no setor de Cardiologia Veterinária da Unesp de Jaboticabal: Evandro, Fabio Nelson, Fernando, Rafael Camacho, Felipe, Ana Paula, Edna, Alejandro, Jorge, Fabrício, Roberto, Raphaela, Jaislane, Vivian, Tamyris, Michelli, Bruno, Matheus, Beatriz e a Elisabeth;

As minhas R2 da clínica médica “soberana”, Tatiana, Michelli e Isabela. Obrigado pelo carinho, pela amizade, pelos ensinamentos, pelas risadas, pelas lágrimas. Carregarei esta lembrança pelo resto da minha vida;

Em especial a minha R1 Fernanda, por todo carinho e amizade durante todos estes anos;

Às residentes Isabela, Maria Eduarda e Letícia da “Nutri Clínica” pela amizade e parceria durante todos estes anos e também por sempre socorrerem o estado de fome das minhas pacientes doando a famosa “latinha”;

Aos meus dois irmãos que ganhei de presente da vida, Gilmar e Stephanie. Vocês fazem a diferença!!! Obrigado pelo companheirismo e pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos;

A minha “R-parça” e “M-parça” Tamyris, pelo companheirismo, pelo conhecimento compartilhado, pelo apoio nos momentos difíceis, pelas risadas, pelos bons momentos, pelos serviços de secretária (risos) e por sempre me manter informado sobre as normas e burocracias da pós;

À Isa por todo amor, carinho, respeito, companheirismo e apoio que tem demonstrado e por me fazer ser o homem mais feliz e sortudo desse mundo;

Ao Henrique e ao Professor Gener que iluminaram minha mente e me ampararam durante a execução dos testes estatísticos;

Aos incríveis e admirados profissionais Professor Dr. Fabio Nelson Gava, Professor Dr. Andriago Barboza De Nardi e Professor Dr. Aparecido Antonio Camacho que compuseram minha banca de avaliação durante a Qualificação do Mestrado e que contribuíram muito para a melhora do meu artigo. Também à estimada professora Dra Mirela Tinucci Costa e ao Professor Dr. Fabio Nelson Gava pelo aceite em participar da banca de Defesa, vocês são nossa fonte de inspiração.

À equipe de profissionais do centro de diagnósticos Animais & Cia, em especial ao Dr. Nivaldo, Dr.^a Caroline e Dr.^a Daniele. Obrigado por todos os ensinamentos e pelas oportunidades de estágio durante a graduação;

Aos amigos Julio, Jefferson e Mariana, por todo tempo compartilhado, por todas as risadas, por todas as lágrimas e suores derramados nas semanas de prova;

Aos inúmeros amigos que conquistei durante minha trajetória em Jaboticabal. São muitos e todos muito importantes;

Ao carinho e apoio das minhas cinco turmas: vet09, vet10, vet11, vet12 e vet13, que tive o prazer de compartilhar momentos inesquecíveis;

A todos os professores, funcionários, pós-graduandos e residentes do Hospital Veterinário da FCAV-UNESP- Jaboticabal, pela ajuda e amizade;

Ao programa de pós-graduação desta instituição e ao CNPq pela bolsa concedida;

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp de Jaboticabal por ter sido a minha casa e por ter contribuído muito com meu crescimento pessoal e profissional nesses últimos sete anos;

Ao Hospital Veterinário e a todos os funcionários da supervisão que sempre me receberam de braços abertos e que sempre me trataram com muito carinho;

Aos tutores que aceitaram o convite e participaram deste estudo;

Aos animais que participaram e contribuíram com o estudo;

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

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
CAPÍTULO 1.....	1
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2– REVISÃO DA LITERATURA.....	1
3 – HIPÓTESES.....	12
4 – OBJETIVOS.....	12
4.1 Gerais.....	12
4.2 Específicos.....	12
5 – REFERÊNCIAS.....	13
CAPÍTULO 2.....	20
1 - INTRODUÇÃO.....	20
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3 - RESULTADOS.....	27
4 - DISCUSSÃO.....	33
5 - CONCLUSÃO.....	35
6 - REFERÊNCIAS.....	36

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal




CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do potencial anti-inflamatório do propanolol como estimulador do sistema nervoso autônomo parassimpático nas neoplasias mamárias em cadelas", protocolo nº 008260/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 01 de junho de 2017.

Vigência do Projeto	02/06/2017 a 06/03/2019
Espécie / Linhagem	Canina
Nº de animais	40
Peso / Idade	Não se aplica
Sexo	Fêmeas
Origem	Rotina de atendimento do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel"

Jaboticabal, 01 de junho de 2017.


Prof. Dr. Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PROPRANOLOL COMO BLOQUEADOR SIMPÁTICO EM CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS

RESUMO - O uso de betabloqueadores tem mostrado implicações significativas na terapia de neoplasias através do bloqueio de adrenoreceptores em tecidos tumorais. O sistema nervoso autônomo simpático apresenta um perfil pró-inflamatório e por estímulo das catecolaminas ocorre à ativação de macrófagos teciduais com liberação de citocinas inflamatórias. Estudos recentes sugerem que estímulos inflamatórios crônicos podem acelerar a progressão do câncer, fato este relacionado à ativação do sistema beta adrenérgico. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do emprego do propranolol sobre a evolução macroscópica dos nódulos mamários assim como a monitoração da função cardíaca. O estudo foi prospectivo, randomizado e longitudinal. Para tanto, 06 cadelas portadoras de tumores de mama (G1) receberam cloridrato de propranolol (0.2 mg/kg/BID, VO, 30 dias) e, outras 08 cadelas também com neoplasia mamária (G0) receberam apenas medicação placebo (BID, VO, 30 dias). Foram realizados exames ecocardiográfico, eletrocardiográficos convencional e Holter, paquimetria tumoral e exame histopatológico. A análise estatística foi baseada em um estudo experimental, cujos resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas no tempo e em seguida Teste de Tukey. O uso do fármaco mostrou segurança sobre os parâmetros cardíacos avaliados e controle sobre o crescimento tumoral quando comparado com o grupo placebo.

Palavras-chave: adrenoreceptores, anticancer, betabloqueadores, inflamação crônica, via anti-inflamatória colinérgica

EVALUATION OF THE EFFECT OF PROPRANOLOL AS A SYMPATHETIC BLOCKER IN BITCHES WITH BREAST NEOPLASMS

ABSTRACT - The use of beta-blockers has shown significant implications in the therapy of neoplasias through the blockade of adrenoreceptors in tumor tissues. The autonomic sympathetic nervous system presents a pro-inflammatory profile and by stimulating the catecholamines occurs to the activation of tissue macrophages with the release of inflammatory cytokines. Recent studies suggest that chronic inflammatory stimuli may accelerate the progression of cancer, a fact related to activation of the beta adrenergic system. Thus, the objective of the present study was to evaluate the influence of the use of propranolol on the macroscopic evolution of the mammary nodes as well as the monitoring of the cardiac function. The study was prospective, randomized, and longitudinal. For this, 06 bitches bearing breast tumors (G1) received propranolol hydrochloride (0.2 mg / kg / BID, VO, 30 days) and another 08 female mammary glanders (G0) received only placebo medication (BID, VO , 30 days). Echocardiographic, conventional electrocardiographic and Holter tests, tumor pachymetry and histopathological examination were performed. The statistical analysis was based on an experimental study, whose results were submitted to analysis of variance (ANOVA) with measures repeated in time and then Tukey's test. The use of the drug showed safety over the evaluated cardiac parameters and control over tumor growth when compared to the placebo group.

Key words: adrenoreceptors, anticancer, beta-blockers, chronic inflammation, cholinergic anti-inflammatory pathway.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACh:** Acetilcolina
ACVIM: Colégio Americano de Medicina Veterinária Interna
AE/Ao: Relação átrio esquerdo e aorta
AE: Átrio esquerdo
ALT: Alanina aminotransferase
BID: Intervalo de 12 horas
bpm: Batimentos por minuto
cm: Centímetro
cm³: Centímetro cúbico; volume calculado pela fórmula:
[[altura*largura*comprimento*3.1416)/6]
COX₂: Ciclooxigenase-2
DIVEd: Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole
DIVEs: Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole
E/A: Relação entre os picos de velocidade das ondas E e A do fluxo transmitral
EF: Fração de ejeção
FC: Frequência cardíaca
G0: Grupo placebo
G1: Grupo propranolol
HIF-1: Fator indutor de hipóxia-1
HMGB1: Proteína do grupo de alta mobilidade 1
IECA: Inibidores da enzima conversora de angiotensina
IL-1: Interleucina 1
IL-10: Interleucina 10
IL-6: Interleucina 6
IL-8: Interleucina 8
Intervalo RR: Intervalo entre duas ondas R
Kg: Quilograma
Log Volume: Valores do volume transformados em base logarítmica
M1: mama torácica cranial
M2: mama torácica caudal
M3: mama abdominal cranial
M4: mama abdominal caudal
M5: mama inguinal
mg: Miligramas
mm: Milímetro
MMP2: Metaloproteinase de matriz 2
MMP7: Metaloproteinase de matriz 7
MMP9: Metaloproteinase de matriz 9
Modo B: Modo bidimensional

Modo M: Modo movimento

ms: Milissegundos

mV: Milivolt

NN médio: Média do valor de todos os ciclos normais medidos durante a avaliação

NNNs: Número normal de três ciclos consecutivos

NNs: Número total de ciclos normais medidos

P (ms): Duração de onda P no exame eletrocardiográfico

P (mV): Amplitude de onda P no exame eletrocardiográfico

p: Valor de p da interação grupo x tempo para ANOVA de médias repetidas

PAS: Pressão arterial sistêmica

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

PIGF: Fator de crescimento placentário

pNN50: Percentagem de intervalos NN adjacentes com diferença de duração maior que 50 ms

PR (ms): Duração de intervalo PR no exame eletrocardiográfico

QRS (ms): Duração do complexo QRS no exame eletrocardiográfico

QRS (mV): Amplitude do complexo QRS no exame eletrocardiográfico

QRSs: Número de complexos QRS no período de 24 horas

QT (ms): Duração do intervalo QT no exame eletrocardiográfico

rMSSD: Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos NN adjacentes

SDANN: Desvio padrão das médias dos intervalos NN obtidos a cada 5 minutos

SDNN: Desvio padrão de todos os intervalos NN

SDNNIDX: Média dos desvios-padrão dos intervalos NN cada 5 minutos

SF: Fração de encurtamento

T (mV): Amplitude da onda T no exame eletrocardiográfico

T-00: Tempo zero; previamente ao início da administração medicamentosa

T-15: Tempo quinze; 15 dias após o início da administração medicamentosa

T-30: Tempo trinta; 30 dias após o início da administração medicamentosa

TGF- β : Fator de Crescimento Transformador Beta

TNF: Fator de necrose tumoral

VEGFs: Fator de crescimento vascular endotelial

VO: Via oral

α -MSH: hormônio alfa-melanócito estimulante

LISTA DE TABELAS**Página**

- Tabela 1 –** Parâmetros ecocardiográficos (média±desvio padrão) de fêmeas caninas com neoplasia mamária expostas ao betabloqueio farmacológico com propranolol durante 0 e 15 e 30 dias (tempos T-00, T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2019). **28**
- Tabela 2 –** Parâmetros da eletrocardiografia Convencional (média±desvio padrão) de fêmeas caninas com neoplasia mamária expostas ao betabloqueio farmacológico com propranolol durante 0 e 15 e 30 dias (tempos T-00, T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2019). **29**
- Tabela 3 –** Parâmetros da eletrocardiografia Holter [média±desvio padrão ou mediana (mínimo-máximo)] de fêmeas caninas com neoplasia mamária expostas ao betabloqueio farmacológico com propranolol durante 0 e 15 e 30 dias (tempos T-00, T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2019). **30**
- Tabela 4 –** Valores médios (média±desvio padrão) resultantes de paquimetria digital dos nódulos mamários de fêmeas caninas expostas ao betabloqueio farmacológico com propranolol durante 0 e 15 e 30 dias (tempos T-00, T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2019). **31**
- Tabela 5 –** Tipos histopatológicos, volume individualizado e estadiamento dos nódulos mamários de fêmeas caninas expostas ao betabloqueio farmacológico com propranolol durante 0 e 15 e 30 dias (tempos T-00, T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2019). **32**

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1– Esquema sobre o mecanismo pró-inflamatório do sistema nervoso autônomo simpático através da sinalização adrenérgica de macrófagos teciduais. UNESP – Jaboticabal (2019).	3
FIGURA 2– Esquema sobre o mecanismo anti-inflamatório do sistema nervoso autônomo parassimpático através do antagonismo competitivo pela ação da acetilcolina sobre macrófagos teciduais. UNESP – Jaboticabal (2019).	5
FIGURA 3– Figura 3. Protocolo experimental ilustrado. Grupo propranolol (G1) e placebo (G0) durante 0 e 15 e 30 dias (tempos T-00 , T-15 e T-30 , respectivamente); D-31 : primeiro dia após a terceira avaliação; ECO : avaliação ecocardiográfica; ECG : avaliação eletrocardiográfica; PA : pressão arterial sistêmica; RX : exame radiográfico; US : exame ultrassonográfico abdominal. UNESP – Jaboticabal (2019).	24
FIGURA 4– Interação das médias do logaritmo do volume individual dos nódulos mamários em fêmeas caninas expostas ao betabloqueio farmacológico com propranolol (G1) e placebo (G0) durante 0 e 15 e 30 dias (tempos T-00, T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2019).	33

CAPITULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

Os mamíferos possuem mecanismos de defesa que os protegem de lesões e patógenos durante a vida toda. Quando exposto a estes fatores, o organismo estimula o início de um processo inflamatório, sendo este autolimitante ou persistente. No decurso da cicatrização normal de feridas e da luta contra as infecções, as células imunitárias inflamatórias aparecem transitoriamente e depois desaparecem, em contraste com a sua persistência em sítios de inflamação crônica, onde a sua presença tem sido associada a várias injúrias teciduais, incluindo fibrose, angiogênese aberrante e neoplasias. Fazendo uma analogia, as neoplasias podem ser comparadas como feridas que nunca cicatrizam, promovendo um constante processo inflamatório (Hanahan & Weidenberg, 2011).

Estudar e entender os mecanismos anti-inflamatórios do sistema nervoso autônomo parassimpático tem despertado um grande interesse no nosso grupo de pesquisa. É um assunto promissor e que pode render inúmeros frutos para o meio científico e clínico. Os betabloqueadores possuem um potencial terapêutico a ser explorado clinicamente, objetivando amenizar os efeitos deletérios da progressão do câncer. Indica-se seu uso como adjuvante a agentes quimioterápicos para o tratamento de pacientes oncológicos, principalmente tumores mamários (redução no desenvolvimento metastático, reincidência tumoral e óbito pela neoplasia) e melanoma (Barron et al., 2011; Powe et al., 2010).

Deste modo, este trabalho visa entender e agregar conhecimento sobre a “via anti-inflamatória colinérgica”, através do bloqueio do sistema nervoso autônomo simpático, de forma medicamentosa com o uso de betabloqueadores em cadelas com neoplasias mamárias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A sobrevivência de um indivíduo é garantida por respostas contínuas do sistema imunológico inato, ocorrendo uma constante vigilância contra agentes

agressores com o propósito de defender o organismo de lesões e infecções. De maneira involuntária, ocorre uma resposta inflamatória localizada para tentar proteger o organismo de possíveis ameaças. Essas respostas do sistema imunológico são controladas pelo sistema nervoso (Tracey, 2002).

O sistema nervoso é composto por sistemas sensoriais, que detectam o estado do corpo e do organismo e, por sistemas motores, que transmitem sinais para o corpo e órgãos. Sabe-se que o sistema nervoso somático (motor) controla os movimentos voluntários e o sistema nervoso autônomo controla as funções viscerais e glandulares, de maneira involuntária. Ainda, o sistema nervoso autônomo pode ser dividido na via simpática e parassimpática, estas podem interagir entre si de maneira sinérgica ou antagônica (Tracey, 2002).

Decerto o sistema nervoso autônomo controla continuamente a frequência cardíaca e respiratória, a pressão sanguínea, a motilidade gastrointestinal, a temperatura corpórea, dentre outras. Estudos identificaram uma via neural que reflexivamente monitora e ajusta a resposta inflamatória. Estímulos inflamatórios ativam vias sensoriais que transmitem informações ao hipotálamo, obtendo uma resposta anti-inflamatória rápida, localizada e subconsciente, prevenindo desta forma a entrada de produtos/resíduos do sítio inflamatório para a corrente sanguínea (Tracey, et al., 1987; Tracey, 2002).

Assim, a integração do sistema nervoso e da resposta inflamatória permite reunir informações sobre eventos invasivos de diversos sítios locais, mobilizar defesa e criar memórias para melhorar as chances de sobrevivência. O controle neural da inflamação aguda é reflexivo, diretamente interconectado e controlável. Ainda, enfatizam-se os mecanismos anti-inflamatórios colinérgicos que inibem a ativação de macrófagos e a liberação de citocinas (Tracey, 2002).

Por outro lado, sabe-se que o sistema nervoso autônomo simpático apresenta um perfil pró-inflamatório, por estímulo das catecolaminas ocorre a ativação de receptores β -adrenérgicos dos macrófagos teciduais (Szelényi, et al., 2000), estes liberam citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), na tentativa de controlar as lesões ou a entrada de microrganismos em sítios específicos. A resposta inflamatória é dependente da concentração do TNF, baixas concentrações culminam em uma resposta discreta e localizada onde se predominam os sinais cardinais da inflamação

(dor, calor, rubor, inchaço); altas concentrações de TNF acarretam em uma resposta sistêmica, pode ocorrer redução do débito cardíaco e indução de trombose microvascular. Em conjunto, pode ocorrer estímulo de outras células e liberação de outras citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 (IL-1) e a proteína do grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1); e, também de mediadores químicos como os eicosanóides, o óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (superóxido, hidroperoxila, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila) que são ativamente mutagênicas para as células cancerígenas vizinhas. Todos esses elementos prolongam e amplificam a resposta inflamatória, o que permite evoluir para um processo de inflamação crônica (Figura 1) (Wang et al., 1999; Tracey, 2002).

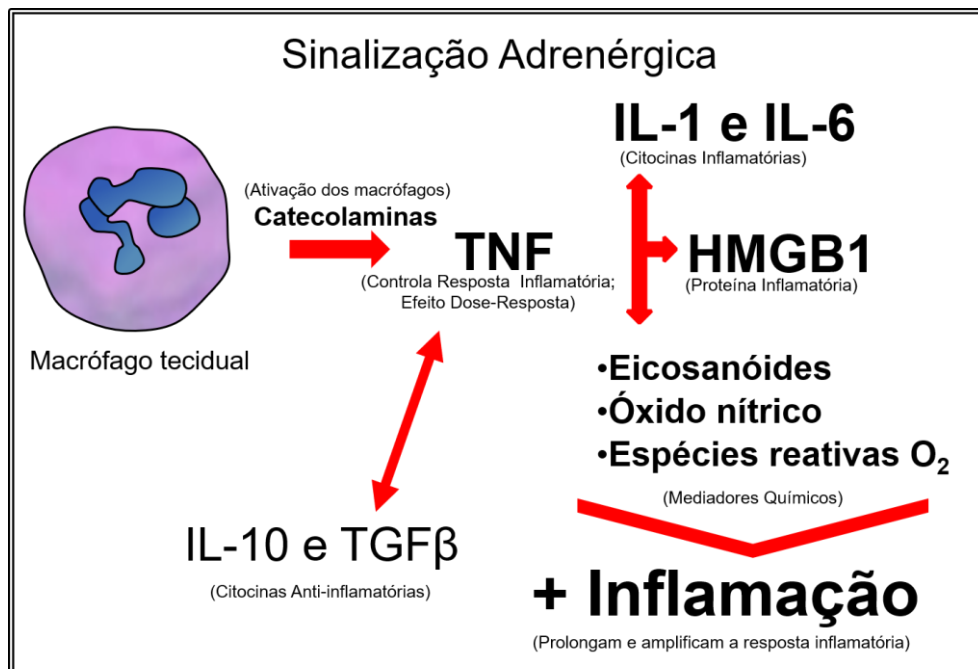


Figura 1. Esquema sobre o mecanismo pró-inflamatório do sistema nervoso autônomo simpático através da sinalização adrenérgica de macrófagos teciduais. **TNF:** Fator de necrose tumoral; **IL-1 e IL-6:** interleucina 1 e interleucina 6; **HMGB1:** proteína do grupo de alta mobilidade 1. UNESP – Jaboticabal (2019).

Os principais neurotransmissores do sistema beta-adrenérgico são as catecolaminas (epinefrina e norepinefrina), cujos receptores (alfa e beta) adrenérgicos são amplamente expressados em tecidos mamários e em outros órgãos (Thaker e Sood, 2008). A norepinefrina é secretada por nervos simpáticos e a epinefrina pela zona medular da glândula adrenal. A sua

secreção é desencadeada pela estimulação do sistema nicotínico e acetilcolínico de nervos simpáticos centrais e periféricos e, da glândula adrenal, respectivamente. A epinefrina e a norepinefrina possuem diferentes afinidades na ligação com diferentes receptores. A primeira se liga preferencialmente aos receptores do tipo β_2 adrenérgicos e a última aos receptores β_1 adrenérgicos (Tang et al., 2013).

Outrossim, a estimulação do sistema nervoso autônomo parassimpático, mediado pela acetilcolina (ACh), age de duas maneiras distintas no controle da inflamação. A primeira é pela ligação direta da ACh nos receptores colinérgicos nicotínicos do tipo α -bungarotoxina dos macrófagos teciduais. A ligação impede a ativação de macrófagos e estimula a liberação de citocinas anti-inflamatórias como a Interleucina 10 (IL-10) e o Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β). Ao impedir a ativação dos macrófagos, ocorre redução na liberação de TNF e de outros mediadores pró-inflamatórios como os glicocorticoides, a IL-1, o HMGB1, a adrenalina e o hormônio alfa-melanócito estimulante (α -MSH) (Figura 2). A segunda maneira é pela produção de fragmentos de receptores TNF que se ligam neutralizando toda essa cascata da resposta inflamatória (Tracey, 2002).

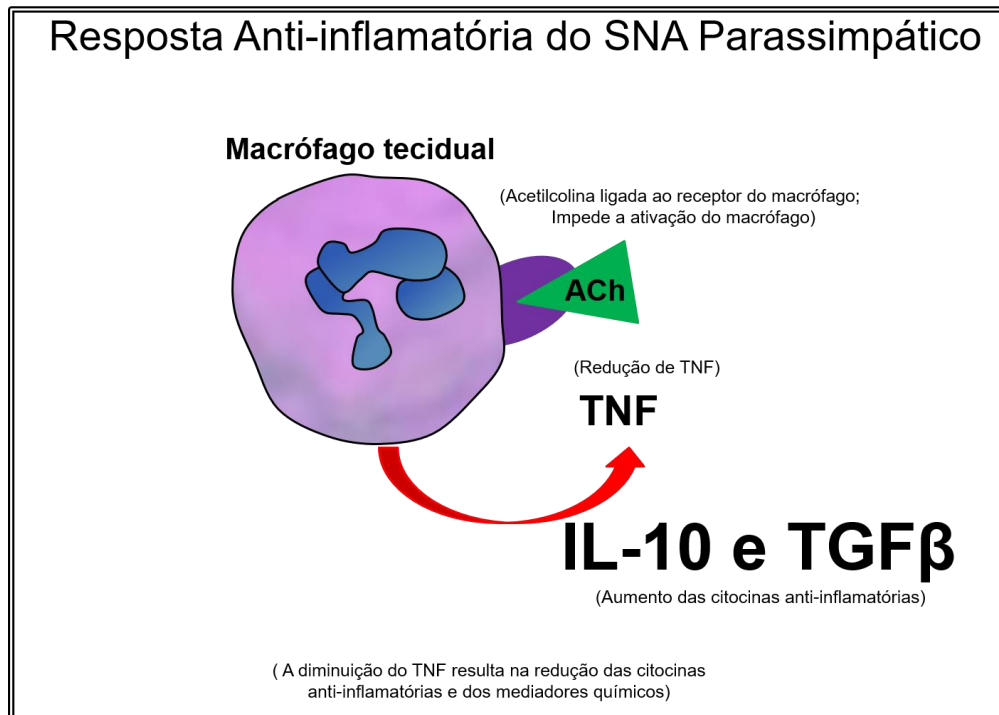


Figura 2. Esquema sobre o mecanismo anti-inflamatório do sistema nervoso autônomo parassimpático através do antagonismo competitivo pela ação da acetilcolina sobre macrófagos teciduais. **IL-10**: interleucina 10; **TGF β**: fator de crescimento transformador beta. UNESP – Jaboticabal (2019).

Desta forma, para melhor compreensão destes mecanismos, os pesquisadores Borovikova et al. (2000), em estudos experimentais, realizaram estimulação elétrica direta no nervo vago de ratos com endotoxemia, ativando a via anti-inflamatória parassimpática. Observaram redução da concentração sérica do TNF em baço, fígado e coração destes animais. Em outro estudo, Bernik et al. (2002) observaram aumento significativo das concentrações de TNF após realização de vagotomia na mesma espécie animal. Com isso os autores concluem que a estimulação vagal, por meios elétricos ou farmacológicos, previne a inflamação e inibe a secreção de citocinas, tornando-se um alvo terapêutico relevante para o controle de doenças inflamatórias.

Em 1987, Tracey et al. realizaram um trabalho com o uso de anticorpos monoclonais agonistas TNF, cujo objetivo era neutralizar a ação do TNF e amenizar o processo inflamatório mostrando-se benéfico ao reduzir os sinais clínicos e melhorar a qualidade de vida em pacientes com Doença de Crohn e Artrite Reumatoide.

Além disso, estudos recentes sugerem que vários fatores biocomportamentais ligados a estímulos de estresse persistente aceleram a

progressão do câncer, fato este relacionado à ativação do sistema beta adrenérgico (Barron et al., 2011). A ativação de receptores beta-adrenérgicos tipo 2 por estresse persistente pode favorecer a ocorrência de neoplasias mamárias através da polarização de macrófagos M2 no microambiente tumoral, favorecendo vários eventos celulares (Qin, et al., 2015). Segundo Pagès et al. (2010), toda lesão neoplásica contém células inflamatórias presentes em densidades que vão desde infiltrações sutis, detectáveis apenas com anticorpos específicos, até inflamações intensas que são evidentes mesmo por técnicas de coloração histoquímica padrão.

Ainda, alguns estudos têm focado na regulação neuroendócrina e progressão de tumores de mama, mediadas pela ativação do sistema nervoso simpático e pela liberação de neurotransmissores adrenérgicos (epinefrina e norepinefrina). O resultado mostra que a sinalização adrenérgica pode regular diversas vias necessárias para a progressão tumoral e o favorecimento de metástase, através de efeitos diretos nas células tumorais (proliferação celular, apoptose e angiogênese) e no microambiente tumoral (Tang, et al., 2013).

Por sua vez, a angiogênese é essencial para o crescimento tumoral e para a ocorrência de metástase. Vários fatores em comum participam deste processo, os quais se destacam os fatores de crescimento vascular endotelial (VEGFs), fator de crescimento placentário (PIGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento Beta ($TGF\beta$), fator indutor de hipóxia-1 (HIF-1), angiopoietina-2, fator de crescimento semelhante à insulina e diversas quimiocinas (Sakurai e Kudo, 2011).

Sólidas evidências relacionam a participação da epinefrina e da norepinefrina na super-regulação da expressão do VEGF na indução da angiogênese, estimulando o crescimento tumoral. Ainda relacionam o envolvimento de outros fatores pró-angiogênicos como a interleucina 6 (IL-6), a interleucina 8 (IL-8), as metaloproteinases de matriz 2 (MMP2) e 9 (MMP9), também mediados pela estimulação das catecolaminas em vários tipos tumorais (Thaker et al., 2006; Lutgendorf et al., 2008). A secreção de MMP9 ocorre por células neoplásicas e por macrófagos isolados de neoplasias ovarianas (Lutgendorf et al., 2008). Estes dados implicam na existência de uma ativação em cascata para favorecer sinergicamente o processo de angiogênese e o desenvolvimento tumoral.

De maneira geral, o processo inflamatório pode ativamente promover tumores por fornecer moléculas bioativas ao microambiente tumoral, incluindo fatores de crescimento que sustentam a sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência que limitam a morte celular, fatores proangiogênicos e enzimas modificadoras de matriz extracelular, que facilitam a angiogênese, a invasão e ocorrência de metástase (Grivennikov et al., 2010; Karnoub e Weinberg, 2007; Qian e Pollard, 2010).

É sabido que a tumorigênese é um processo multifatorial complexo, controlada por uma rede de conexão biológica. A massa tumoral não é apenas uma entidade dependente da proliferação de células tumorais. Ela recruta múltiplas células distintas para formar o estroma tumoral, desenvolver sistema vascular, linfático e nervoso constituindo o microambiente tumoral. Evidências clínicas e experimentais tem mostrado que alguns cânceres são inervados por fibras nervosas capazes de secretar neurotransmissores que agem diretamente nas células neoplásicas. Estas não só expressam receptores aos neurotransmissores, como também podem sintetiza-los (Tang et al., 2013). Uma sequência de eventos moleculares é usada para delinear o processo de inclusão local de células tumorais: invasão, intravasão, transporte, inoculação, extravasão, formação de micrometastase e colonização (formação tumoral metastática macroscópica) (Hanahan e Weidenberg, 2011; Spano et al., 2012). As catecolaminas podem induzir a liberação de MMP2, MMP7 e MMP9 e ainda, a degradação da matriz extracelular para facilitar os processos de invasão e intravasão.

Em contra partida, o uso de betabloqueadores do tipo β 2-antagonistas podem suprimir a secreção de metaloproteinases e reverter os efeitos dos eventos supracitados (Landen et al., 2007; Guo et al., 2009). A administração de propranolol pode inibir a liberação de fatores pró-inflamatórios e pró-neoplásicos, destacando o potencial valor terapêutico do uso de betabloqueadores como coadjuvantes ao tratamento de pacientes oncológicos (Park et al., 2011; Tang et al., 2013).

Em relação ao fármaco propranolol, trata-se de um antagonista competitivo dos receptores adrenérgicos β 1 e β 2, amplamente aplicado em doenças cardiovasculares como hipertensão arterial, arritmias cardíacas, taquicardias, cardiomiopatia hipertrófica obstrutiva, angina pectoris, ansiedade

e tremor essencial. Quando o acesso aos sítios receptores beta-adrenérgicos é bloqueado pelo cloridrato de propranolol, as respostas cronotrópica e inotrópica negativas e vasodilatadora do estímulo beta-adrenérgico são proporcionalmente diminuídas. O fármaco é bem absorvido por via oral e possui importante metabolismo hepático de primeira passagem, apresenta meia-vida de eliminação de 3 a 6 horas e alto índice de ligação às proteínas plasmáticas (80-95%). É um fármaco geralmente bem tolerado, mas pode apresentar efeitos adversos leves e transitórios pela ação cronotrópica e inotrópica negativa, resultando em redução do débito cardíaco e presença de sinais como bradicardia, descompensação dos quadros de insuficiência cardíaca congestiva, hipotensão, diarreia e broncoespasmo, principalmente (Fiona et al., 2010).

Por décadas, os betabloqueadores têm sido amplamente empregados no tratamento de algumas cardiopatias. Recentemente, estes fármacos têm mostrado implicações significativas na terapia de neoplasias através do bloqueio de adrenoreceptores em tecidos tumorais (Tang et al., 2013). A ação do beta bloqueio de receptores β -adrenérgicos em neoplasias mamárias, gerou redução da proliferação celular *in vitro* e a regressão tumoral *in vivo*, como observado por Tang et al. (2013) em outras publicações (Carie e Sebit, 2007; Perez Piñero, et al., 2012).

Fortalecendo os fatos, Zhang et al. (2009) mostraram que a utilização *in vitro* de propranolol promove redução na taxa de proliferação celular e, conseqüentemente induz apoptose em linhagens celulares epiteliais de tumores pancreáticos em humanos. Além disso, a estimulação *in vitro* com norepinefrina em células neoplásicas de pâncreas humano resultou em aumento da proliferação e migração celular e incremento da expressão de MMP2, MMP9 e VEGF, porém o uso do propranolol inibiu a presença desses fatores (Guo et al., 2009).

Corroborando com os fatos, Coelho et al. (2015) realizaram um estudo *in vitro*, estimulando o crescimento de linhagens celulares humanas de adenocarcinoma de cólon (HT-29) por meio das catecolaminas. Alguns betabloqueadores foram utilizados para tentar impedir a proliferação celular e, o propranolol se mostrou altamente capaz de realiza-la. Os autores sugerem a

elaboração de pesquisas *in vivo*, cujo objetivo é a utilização deste fármaco de efeito promissor em pacientes oncológicos.

Não bastando Park et al. (2011), em estudo *in vitro* com células ovarianas pré-tratadas com propranolol, relataram ausência de indução do VEGF e da proteína HIF-1 α (fator indutor de hipóxia) mesmo com o estímulo da norepinefrina. Também em estudos com linhagens celulares ovarianas, Landen et al. (2007) verificaram que o uso de propranolol inibiu a ativação da proteína STAT3, sendo esta um fator de transcrição que contribui com várias vias pró-oncogênicas.

Em outra pesquisa, a norepinefrina se mostrou capaz de aumentar o processo de migração de células de carcinoma de cólon SW480 e este efeito foi reduzido pelo uso do propranolol, como indicado pelo estudo *in vitro* realizado por Masur et al. (2001).

Nem sempre os estudos *in vitro* podem ser extrapolados para os estudos *in vivo* em seres humanos, sendo essenciais para verificar e estabelecer a veracidade de um fenômeno ou efeito. No entanto, vários estudos observacionais relatados até o presente momento indicam um crescente número de evidências clínicas sobre o efeito benéfico, pela ação dos betabloqueadores, no controle de várias neoplasias.

Deste modo, o estudo observacional de Powe et al. (2010), apontou aumento na taxa de sobrevivência (71%) e redução metastática (57%) em mulheres hipertensas portadoras de neoplasia mamária, expostas a terapia com betabloqueadores. Por outro lado, Shah et al. (2011) não encontrou melhora na sobrevivência de pacientes oncológicos mistos tratados com betabloqueadores, em estudo retrospectivo.

Ainda, o uso de propranolol, por bloqueio de receptores β 2 adrenérgicos, pode reduzir satisfatoriamente a progressão de tumores de mama e a taxa de mortalidade em mulheres com neoplasias mamárias, quando comparadas com pacientes que não fizeram uso de betabloqueadores. Porém, o uso de atenolol (β 1 bloqueador) não mostrou diferenças significativas considerando os mesmos pontos supracitados (Barron et al., 2011).

Outro estudo observacional, realizado na Califórnia, revelou o uso de betabloqueadores correlacionado à menor recorrência e mortalidade relacionada ao câncer de mama (Ganz et al., 2011). Por outro lado, um estudo

observacional realizado na Dinamarca com mulheres portadoras de neoplasias mamárias não metastáticas, não observou redução na recorrência de câncer em pacientes tratados com metoprolol ou sotalol (Sørensen et al., 2013).

Em medicina veterinária, segundo a revisão de Cintra et al. (2014), as neoplasias mamárias em cadelas assumem como as mais prevalentes neoplasias na fêmea canina, comumente acometem animais entre 7 e 12 anos de idade. O exame histopatológico é o padrão ouro para o diagnóstico, pois permite identificar e classificar o grau de malignidade, a presença de necrose e de invasão linfática e vascular dos tumores mamários (Lana et al., 2007; De Nardi et al., 2009; Cassali et al., 2011). Além das neoplasias, outras doenças adquiridas podem ser observadas em animais de meia idade em diante, de acordo com Camacho et al. (2001) a degeneração mixomatosa da valva mitral ou endocardiose é a cardiopatia mais frequente e acomete animais de raças pequenas com idade média entre 8 e 11 anos.

Em uma pesquisa retrospectiva, Diaz et al. (2012) observaram que a progressão média na sobrevida de mulheres que utilizaram betabloqueadores no tratamento de neoplasias epiteliais ovarianas foi significativamente maior do que a dos pacientes que não receberam o tratamento (27 e 17 meses respectivamente).

Novamente, outra investigação observacional apontou um efeito protetor semelhante com a associação dos betabloqueadores com inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e bloqueadores dos receptores de angiotensina. Foram verificados durante a pesquisa, o aumento na sobrevida, redução da hospitalização e da progressão tumoral em pacientes com câncer de cólon em estágios avançados (Engineer et al., 2013). Em contra partida, outros estudos observacionais não indicaram efeito benéfico da utilização de betabloqueadores em pacientes com câncer de colorretal (Jansen et al., 2012; Hicks et al., 2013).

De forma similar, o uso de betabloqueadores se mostrou eficiente ao reduzir a progressão tumoral em 90%, como relatado nos estudos de De Giorgi et al. (2011) e, ao aumentar a sobrevida de pacientes humanos com melanoma maligno (De Giorgi et al., 2012).

Ainda, utilizando modelo experimental em ratos inoculados com células MADG106 singênicas para avaliação metastática de carcinomas pulmonares,

Brenish et al. (2008) mostraram que a associação de propranolol e inibidores de COX₂ (etodolac) no período perioperatório, iniciado três dias antes do procedimento cirúrgico em um grupo e, uma hora antes em outro, reduziu satisfatoriamente a progressão tumoral, a incidência de metástase e melhorou a competência imunológica desses animais antes e após a cirurgia.

Em outra pesquisa, utilizando imagens de bioluminescência para rastrear o desenvolvimento de metástases em modelo ortotópico de câncer de mama em ratos, observaram que a ativação neuroendócrina induzida pelo estresse não apresentou impactos significativos no crescimento tumoral, mas induziu um aumento de 30 vezes na formação de metástase em tecidos distantes (linfonodos e pulmões) e, os animais expostos ao tratamento com propranolol apresentaram redução do número de metástase (Sloan et al., 2010). Segundo Chen et al. (2018), a sinalização adrenérgica aumentou a colonização de células neoplásicas no pulmão de ratos e, este efeito foi amenizado pelo uso de propranolol.

Mais uma vez, o grupo de pesquisa de Palm et al. (2006) descreveram que o uso de propranolol reduziu a formação metastática após a sua indução com células de carcinoma de próstata (PC-3) em linfonodos lombares de camundongos, ao serem estimuladas pela norepinefrina por meio de bombas microscópicas. Observado em outra pesquisa, o propranolol mostrou assegurar redução no desenvolvimento de adenocarcinoma de ductos pancreáticos em estudos com hamsters (Al-Wadei et al., 2009).

De forma admirável, a administração de propranolol, na dosagem de 2 mg/kg a cada 24 horas, se mostrou capaz de inibir o crescimento de hemangioma em onze crianças. Com apenas um dia de tratamento encontrou-se alteração na coloração dos nódulos, de vermelho intenso para roxo. Ao decorrer do tratamento, foram observadas alteração na textura (amolecimento) e involução dos nódulos. Os autores relacionam os efeitos à vasoconstrição, redução da expressão dos genes do fator de crescimento básico de fibroblastos e do fator de crescimento vascular endotelial e, desencadeamento de apoptose das células endoteliais dos capilares (Léauté-labrèze et al., 2008). Resultados semelhantes foram encontrados nas pesquisas de (Bonini et al., 2011; Cavaleiro et al., 2011; Tamagno et al., 2011), com resposta clínica de 7

dias e resolução da lesão em 4 meses, com dosagem terapêutica gradativa máxima de 2 mg/kg, a cada 8 horas (Cavaleiro et al., 2011).

Por fim, Benish et al. (2008) defenderam a administração de betabloqueadores em períodos pré e pós-operatórios e confirmaram a melhora do estado imunológico e redução nas chances de ocorrência de metástase em diversos modelos tumorais.

Assim sendo, como foi exposto, o uso de betabloqueadores beneficia os pacientes através da redução da progressão tumoral, da formação de metástases, da recorrência tumoral e da taxa de mortalidade. Segundo Sporn et al. (1996), 30% de todos os pacientes que receberam tratamento pelas neoplasias mamárias desenvolveram metástase. Palm et al., (2006) citaram que 90% de todas as mortes por neoplasias ocorrem devido às metástases e não pelo tumor primário propriamente dito. Vale ressaltar que a migração de células cancerosas é o gatilho para a ocorrência de metástases.

Apesar de um fármaco bastante promissor, o propranolol tem sido pobremente explorado em medicina veterinária. Mediante ao conteúdo exposto e a alta prevalência de cadelas com neoplasias mamárias na rotina da clínica médica de pequenos animais é de grande interesse científico a realização de estudos para avaliar a ação do propranolol sobre tumores mamários, buscando desta forma, a elaboração de novos protocolos terapêuticos que possibilitem o qualidade de vida e aumento na sobrevida dos pacientes.

3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

Considerando-se o potencial efeito inflamatório do sistema nervoso autônomo simpático na regulação da resposta inflamatória e do sistema imunológico, se hipotetiza o emprego de fármacos betabloqueadores como o propranolol no tratamento coadjuvante ao protocolo utilizado na terapia das neoplasias mamárias em cadelas, desta forma o referido fármaco poderia modular o processo inflamatório e causar regressão tumoral?

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do presente estudo foi a avaliação clínica do uso do propranolol em cadelas com neoplasias mamárias malignas por meio da paquimetria dos nódulos mamários e diagnóstico histopatológico, assim como a monitoração da função cardíaca através de exames ecocardiográfico, eletrocardiográfico convencional e Holter.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a influência do emprego do propranolol sobre os parâmetros ecocardiográficos, eletrocardiográficos convencionais e Holter, e pressão arterial.
- ✓ Avaliar a influência do emprego do propranolol sobre a evolução macroscópica dos nódulos mamários por meio da mensuração em três dimensões (altura x largura x profundidade).

5- REFERÊNCIAS

AL-WADEI, H. A. N.; AL-WADEI, M. H.; SCHULLER, H. M. Prevention of pancreatic cancer by the beta-blocker propranolol. **Anticancer Drugs**, v. 20, n. 6, p. 1–13, 2009.

BARRON, T. I.; CONNOLLY, R. M.; SHARP, L.; BENNETT, K.; VISVANATHAN, K. Beta blockers and breast cancer mortality: A population-based study. **Journal Of Clinical Oncology**, v. 29, n. 19, p. 2635–2644, 2011.

BENISH, M.; BARTAL, I.; GOLDFARB, Y.; LEVI, B.; AVRAHAM, R.; RAZ, A.; BEN-ELIYAHU, S. Perioperative use of β -blockers and cox-2 inhibitors may improve immune competence and reduce the risk of tumor metastasis. **Annals Of Surgical Oncology**, v.15, n. 7, p. 2042–2052, 2008.

BERNIK, T. R. et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. **The Journal Of Experimental Medicine**, v.195, n. 6, p. 781–8, 2002.

BONINI, F. K.; BELLODI, F. S.; SOUZA, E. M. Hemangioma infantil tratado com propranolol. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 1–5, 2011.

BOROVIKOVA, L. V.; IVANOVA, S.; ZHANG, M.; YANG, H.; BOTCHKINA, G. I.; WATKINS, L. R.; WANG, H.; ABUMRAD, N.; EATON, J. W.; TRACEY, K. J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v.405, n. 6785, p. 458–462, 2000.

CAMACHO, A.A. **Aspectos clínicos y fisiopatológicos de la ICC**. In: BELERENIAN, G.C., MUCHA, C.J., CAMACHO, A.A. Afecciones Cardiovasculares en pequeños animales. Inter-médica, Buenos Aires, 2001.

CARIE, A. E.; SEBTI, S. M. A chemical biology approach identifies a beta-2 adrenergic receptor agonist that causes human tumor regression by blocking the Raf-1/Mek-1/Erk1/2 pathway. **Oncogene**, v. 26, n. 26, p. 3777–3788, 2007.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; OLIVEIRA, L. O.; SUEIRO, F. A. R.; BESERRA, H. E. O.; BERTAGNOLLI, A. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B.; ARAUJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; MONTEIRO, L. N.; NUNES, F. C.; HORTA, R. S.; REIS, D. C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; MAGALHÃES, G. M.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; TANAKA, N. M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; TERRA, E. M.; SALVADOR, R. C. L.; JARK, P. C.; DELECRODI, J. E. R.; NASCIMENTO, N. A.; SILVA, D. N.; SILVA, L. P.; FERREIRA, K. C. R. S.; FREHSE, M. S.; DI SANTIS, G. W.; SILVA, E. O.; GUIM, T. N.; KERR, B.; CINTRA, P. P.; SILVA, F. B.F.; LEITE, J. S.; MELLO, M. F. V.; FERREIRA, M. L. G.; FUKUMASU, H.; SALGADO, B. S.; TORRES, R. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors – 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 2, p. 38-69, 2014.

CAVALEIRO, L. H. S.; VIANA, F. O.; UNGER, D. A. A.; BITTENCOURT, M. J. S. Hemangiomas extensos da infância tratados com propranolol: Relato de dois casos. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 10, n. 2, p. 173–176, 2011.

CHEN, H.; LIU, D.; GUO, L.; CHENG, X.; GUO, N.; SHI, M. Chronic psychological stress promotes lung metastatic colonization of circulating breast cancer cells by decorating a pre-metastatic niche through activating Beta-adrenergic signaling. **Journal Of Pathology**, v. 244, p. 49–60, 2018.

CINTRA, P. P.; De PAULA, C. A. T.; CALAZANS, S. G.; SOUZA, J. L.; MAGALHÃES, G. M. Reclassificação e determinação do tipo histológico predominante em neoplasias mamárias caninas do hospital veterinário da universidade de Franca nos anos de 2010 a 2012. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18, p. 2014-2606.

COELHO, M.; MOZ, M.; CORREIA, G.; TEIXEIRA, A.; MEDEIROS, R.; RIBEIRO, L. Antiproliferative effects of β -blockers on human colorectal cancer cells. **Oncology Reports**, v. 33, n. 5, p. 2513–2520, 2015.

DE GIORGI, V.; GANDINI, S.; GRAZZINI, M.; BENEMEI, S.; MARCHIONNI, N.; GEPPETTI, P. Beta-Blockers: a New and Emerging Treatment for Melanoma. **Recenti progressi in medicina**, v. 103, n. 1, p. 11–16, 2012.

DE GIORGI, V.; GRAZZINI, M.; GANDINI, S.; BENEMEI, S.; LOTTI, T.; MARCHIONNI, N.; GEPPETTI, P. Treatment With β -Blockers and Reduced Disease Progression in Patients With Thick Melanoma. **Archives of Internal Medicine**, v. 171, n. 8, p. 1–2, 2011.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; ROCHA, N. S.; FERNANDES, S. C. **Neoplasias Mamárias**. In: DALECK, C.R; DE NARDI, A.B; RODASKI, S. *Oncologia em cães e gatos*. 1. ed. São Paulo: Roca, cap. 26, p. 371-383.2009.

DIAZ, E. S.; KARLAN, B. Y.; LI, A. J. Impact of beta blockers on epithelial ovarian cancer survival. **Gynecologic Oncology**, v. 127, n. 2, p. 375–378, 2012.

ENGINEER, D. R.; BURNEY, B. O.; HAYES, T. G.; GARCIA, J. M. Exposure to ACEI/ARB and β -Blockers Is Associated with Improved Survival and Decreased Tumor Progression and Hospitalizations in Patients with Advanced Colon Cancer. **Translational Oncology**, v. 6, n. 5, p. 539–545, 2013.

FIONA, C; ELLIOT, J; LEES, P. **Comparative And Veterinary Pharmacology**. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. v.199. 2010.

GANZ, P. A.; HABEL, L. A.; WELTZIEN, E. K.; CAAN, B J.; COLE, S. W. . Examining the influence of beta blockers and ACE inhibitors on the risk for breast cancer recurrence: Results from the LACE cohort. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 129, n. 2, p. 549–556, 2011.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.

GUO, K.; MA, Q.; WANG, L.; HU, H.; LI, J.; ZHANG, D.; ZHANG, M. Norepinephrine induced invasion by pancreatic cancer cells is inhibited by propranolol . **Oncology Reports Journal**, v. 22, n. 4, p. 825–830, 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer : The Next Generation. **Seminars in Cancer Biology**, v.144, n. 5, p. 1–97, 2011.

HICKS, B. M.; MURRAY, L. J.; POWE, D. G.; HUGHES, C. M.; CARDWELL, C. R. β -Blocker usage and colorectal cancer mortality: A nested case-control study in the UK clinical practice research datalink cohort. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 12, p. 3100–3106, 2013.

JANSEN, L.; BELOW, J.; CHANG-CLAUDE, J.; BRENNER, H.; HOFFMEISTER, M. Beta blocker use and colorectal cancer risk. **Cancer**, v. 118, n. 16, p. 3911–3919, 2012.

KARNOUB, A. E.; WEINBERG, R. A. Chemokine networks and breast cancer metastasis. **Breast Disease**, v. 26, n. 1, p. 75–85, 2007.

LANA, S. E; RUTTEMAN, G. R; WITHROW, S.J. **Tumors Of The Mammary Gland**. In: WITHROW, S. J; VAIL, D. M. Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 4. ed. Missouri: Saunders Elsevier, cap. 26, p. 619-636.2007.

LANDEN, C. N.; LIN, Y. G.; PENA, G. N. A.; DAS, P. D.; AREVALO, J. M.; KAMAT, A. A.; HAN, L. Y.; JENNINGS, N. B.; SPANNUTH, W. A.; THAKER, P. H.; LUTGENDORF, S. K.; SAVARY, C. A.; SANGUINO, A. M.; LOPEZ-BERESTEIN, G. .; COLE, S. W.; SOOD, A. K. Neuroendocrine modulation of signal transducer and activator of transcription-3 in ovarian cancer. **Cancer Research**, v. 67, n. 21, p. 10389–10396, 2007.

LÉAUTÉ-LABRÈZE, C.; de la ROQUE, E. D.; HUBICHE, T.; BORALEVI, F.; THAMBO, J.; TAÏEB, A. Propranolol for Severe Hemangiomas of Infancy. **The New England Journal Of Medicine**, v.24, p. 2649–2651, 2008.

LUTGENDORF, S. K.; LAMKIM, D. .; JENNINGS, N. B.; AREVALO, J. M. G. PENEDO, F.; DEGEEST, K., LANGLEY, R. R.; LUCCI, J. A.; COLE, S. W.; LUBAROFF, D. M.; SOOD, A. K. Biobehavioral Influences on Matrix Metalloproteinase Expression in Ovarian Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 21, p. 1–17, 2008.

MASUR, K.; NIGGEMANN, B.; ZANKER, K. S.; ENTSCHLADEN, F. Norepinephrine-induced migration of SW 480 Colon Carcinoma Cells Is Inhibited by B-Blockers. **Cancer Research**, v. 61, n. 13, p. 2866–2869, 2001.

PAGÈS, F.; GALON, J.; DIEU-NOSJEAN, M. C.; TARTOUR, E.; SAUTÈS-FRIDMAN, C.; FRIDMAN, W. H. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. **Oncogene**, v. 29, p. 1093–1102, 2010.

PALM, D.; LANG, K.; NIGGEMANN, B.; DRELL IV, T. L.; MASUR, K.; ZAENKER, K. S.; ENTSCHLADEN, F. The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by β -blockers. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 11, p. 2744–2749, 2006.

PARK, S. Y.; KANG, J. H.; JEONG, K. J.; LEE, J.; HAN, J. W.; CHOI, W. S.; KIM, Y. K.; KANG, J.; PARK, C. G.; LEE, H. Y. Norepinephrine induces VEGF expression and angiogenesis by a hypoxia-inducible factor-1 α protein-dependent mechanism. **International Journal of Cancer**, v.128, n. 10, p. 2306–2316, 2011.

PEREZ PIÑERO, C.; BRUZZONE, A.; SARAPPA, M. G.; CASTILLO, L. F.; LÜTHY, I. A. Involvement of α 2- and β 2-adrenoceptors on breast cancer cell proliferation and tumour growth regulation. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 2, p. 721–736, 2012.

POWE, D. G.; VOSS, M. J.; ZÄNKER, K. S.; HABASHY, H. O.; GREEN, A. R.; ELLIS, I. O.; ENTSCHLADEN, F. Beta-blocker drug therapy reduces secondary cancer formation in breast cancer and improves cancer specific survival. **Oncotarget**, v. 1, n. 7, p. 628–638, 2010.

QIAN, B.; POLLARD, J. W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39–51, 2010.

QIN, J.; JIN, F.; WANG, Y. Adrenergic receptor β 2 activation by stress promotes breast cancer progression through macrophages M2 polarization in tumor microenvironment. **BMB Reports**, v. 48, p. 295–300, 2015.

SAKURAI, T.; KUDO, M. Signaling pathways governing tumor angiogenesis. **Oncology**, v.81, n. 1, p. 24–29, 2011.

SHAH, S. M.; CAREY, I. M.; OWEN, C. G.; HARRIS, T.; DEWILDE, S. COOK, D. G. Does beta-adrenoceptor blocker therapy improve cancer survival? Findings from a population-based retrospective cohort study. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 157–161, 2011.

SLOAN, E. K.; PRICEMAN, S. J.; COX, B. F.; YU, S.; MATTHEW, A.; TANGKANANGNUKUL, V.; AREVALO, J. M.; MORIZONO, K.; BREANNE, D. W.; WU, L.; SOOD, A. K.; COLE, S. W. Sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer. **Cancer Research**, v. 70, n. 18, p. 7042–7052, 2010.

SØRENSEN, G. V.; GANZ, P. A.; COLE, S. W.; PEDERSEN, L. A.; SØRENSEN, H. T.; CRONIN-FENTON, D. P.; GARNE, J. P.; CHRISTIANSEN, P. M.; LASH, T. L.; AHERN, T. P. Use of β -Blockers, Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors, Angiotensin II Receptor Blockers, and Risk of Breast Cancer Recurrence: A Danish Nationwide Prospective Cohort Study. **Journal Of Clinical Oncology: Official Journal Of The American Society Of Clinical Oncology**, v. 31, n. 18, p. 2265–2272, 2013.

SPANO, D.; HECK, C.; DE ANTONELLIS, P.; CHRISTOFORI, G.; ZOLLO, M. Molecular networks that regulate cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v.22, n. 3, p. 1–2, 2012.

SPORN, M. B. The war on cancer. **The Lancet**, v. 347, n. 9012, p. 1377–1381, 1996.

SZELÉNYI, J.; KISS, J. P. ; SZELÉNYI, M.; VIZI, E. S. Contribution of Differently Localized alpha 2 and beta-adrenoceptors in the Modulation of TNF- α and IL-10 Production in Endotoxemic Mice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, n. 145, p. 145–153, 2000.

TAMAGNO, M.; BIBAS, B. J.; MINAMOTO, H.; ALFINITO, F. S.; TERRA, R. M.; JANETE, F. B. Hemangioma subglótico e mediastinal em criança: tratamento com propranolol. **Jornal Brasileiro De Pneumologia**, v. 37, n. 3, p. 1–4, 2011.

TANG, J.; LI, Z.; LU, L.; CHO, C. H. β -Adrenergic system , a backstage manipulator regulating tumour progression and drug target in cancer therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v.23, n. 6, p. 533–542, 2013.

THAKER, P. H.; HAN, L. Y.; KAMAT, A. A.; AREVALO, J. M.; TAKAHASHI, R.; LU, C.; JENNINGS, N. B.; ARMAIZ-PENA, G.; BANKSON, J. A.; RAVOORI, M.; MERRITT, W. M.; LIN, Y. G.; MANGALA, L. S.; KIM, T. J.; COLEMAN, R. L.; LANDEN, C. N.; LI, Y.; FELIX, E.; SANGUI, A. K. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. **Nature Medicine**, v. 12, n. 8, p. 939–944, 2006.

THAKER, P. H.; SOOD, A. K. The Neuroendocrine Impact of Chronic Stress on Cancer Premal. **Seminars in Cancer Biology**, v. 18, n. 3, p. 164–170, 2008.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v.420, n. 6917, p. 853–859, 2002.

TRACEY, KEVIN J.; FONG, Y.; HESSE, D. G.; MANOGUE, K. R.; LEE, A. T.; KUO, G. C.; LOWRY, S. F.; CERAMI, A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. **Nature**, v. 330, n. 6149, p. 662–664, 1987.

WANG, H.; BLOOM, O.; ZHANG, M.; VISHNUBHAKAT, J. M.; OMBRELLINO, OM.; FRAZIER, A.; YANG, H.; IVANOVA, S.; BOROVIKOVA, L.; MANOGUE, K. R.; FAIST, E.; ABRAHAM, E.; ANDERSSON, J.; ANDERSON, U.; MOLINA, P. E.; ABUMRAD, N. N.; SAMA, A.; TRACEY, K. J. HMG-1 as a Late Mediator of Endotoxin Lethality in Mice. **Science**, v. 285, p. 248–251, 1999.

ZHANG, D.; MA, Q.; SHEN, S.; HU, H. Inhibition of Pancreatic Cancer Cell Proliferation by Propranolol Occurs Through Apoptosis Induction. The Study of A-Adrenoceptor Antagonist's Anticancer Effect in Pancreatic Cancer Cell. **Pancreas Journal Of Neuroendocrine Tumors And Pancreatic Diseases And Sciences**, v. 38, n. 1, p. 94–100, 2009.

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PROPRANOLOL COMO BLOQUEADOR SIMPÁTICO NO TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS

Murillo Daparé Kirnew^{1*}, Roberto Ampuero Navarrete¹, Wilmer Alejandro Zamora Restan¹, Matheus Folgearini Silveira¹, Raphaela Arantes Marques Canola¹, Jaislane Bastos Braz¹, Tamyris Beluque¹, Igor Luiz Salardani Senhorello¹, Aparecido Antonio Camacho¹

1-Universidade Estadual Paulista- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP – Campus de Jaboticabal.

*Correspondência: murillo_kirnew@yahoo.com.br

RESUMO O uso de betabloqueadores tem implicações significativas na terapia de neoplasias através do bloqueio de adrenoreceptores em tecidos tumorais. O sistema nervoso autônomo simpático apresenta perfil pró-inflamatório, que por estímulo das catecolaminas ocorre a ativação de macrófagos teciduais com liberação de citocinas inflamatórias. Estudos recentes sugerem que estímulos inflamatórios crônicos podem acelerar a progressão do câncer, fato este relacionado à ativação do sistema beta adrenérgico. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do emprego do propranolol sobre a evolução macroscópica dos nódulos mamários assim como a monitoração da função cardíaca. O estudo foi prospectivo, randomizado e longitudinal. Para tanto, 06 cadelas portadoras de tumores de mama (G1) receberam cloridrato de propranolol (0.2 mg/kg/BID, VO, 30 dias) e, outras 08 cadelas também com neoplasia mamária (G0) receberam apenas medicação placebo (BID, VO, 30 dias). Foram realizados exames ecocardiográfico, eletrocardiográficos convencional e Holter, paquimetria tumoral e exame histopatológico. A análise estatística foi baseada em um estudo experimental, cujos resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas no tempo e em seguida Teste de Tukey. O uso do fármaco mostrou segurança sobre os parâmetros cardíacos avaliados e controle sobre o crescimento tumoral quando comparado com o grupo placebo.

Palavras-chave: adrenoreceptores, anticancer, betabloqueadores, inflamação crônica, via anti-inflamatória colinérgica

1. INTRODUÇÃO

A forma que o sistema nervoso autônomo parassimpático atua sobre os mecanismos anti-inflamatórios é um assunto promissor e que pode render inúmeros frutos para o meio científico e clínico. Os betabloqueadores possuem um potencial terapêutico a ser explorado clinicamente, objetivando controlar a resposta inflamatória e amenizar os efeitos deletérios da progressão do câncer. Indica-se seu uso como adjuvante a agentes quimioterápicos para o tratamento de pacientes oncológicos (Powe et al., 2010; Barron et al., 2011).

Estudos identificaram uma via neural que reflexivamente monitora e ajusta a resposta inflamatória (Tracey et al., 1987; Tracey, 2002). Sabe-se que o sistema nervoso autônomo simpático apresenta um perfil pró-inflamatório, por

estímulo das catecolaminas (Qin et al, 2015) ocorre à ativação de receptores β -adrenérgicos dos macrófagos teciduais (Szelényi et al., 2000), estes liberam citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF). A resposta inflamatória é dependente da concentração do TNF, sendo que baixas concentrações culminam em uma resposta discreta e localizada; altas concentrações acarretam em uma resposta sistêmica e pode ocorrer redução do débito cardíaco e indução de trombose microvascular. Em conjunto, pode levar a liberação de outras citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 (IL-1) e a proteína do grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1); e, também de vários mediadores químicos que são ativamente mutagênicas para as células cancerígenas vizinhas. Todos esses elementos prolongam e amplificam a resposta inflamatória, o que permite evoluir para inflamação crônica (Wang et al., 1999; Tracey, 2002).

Os principais neurotransmissores do sistema beta-adrenérgico são as catecolaminas (epinefrina e norepinefrina), cujos receptores (alfa e beta) adrenérgicos são amplamente expressados em tecidos mamários e em outros órgãos (Thaker e Sood, 2008).

De contrapartida, o sistema nervoso autônomo parassimpático, mediado pela acetilcolina (ACh), age de duas maneiras distintas no controle da inflamação. A primeira é pela ligação direta da ACh nos receptores colinérgicos nicotínicos do tipo α -bungarotoxina dos macrófagos teciduais. A ligação impede a ativação de macrófagos e estimula a liberação de citocinas anti-inflamatórias como a Interleucina 10 (IL-10) e o Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β), ocorrendo redução na liberação de TNF e de outros mediadores pró-inflamatórios. A segunda maneira é pela produção de fragmentos de receptores TNF que se ligam neutralizando toda essa cascata da resposta inflamatória (Tracey, 2002).

Segundo Pagès et al. (2010), toda lesão neoplásica contém células inflamatórias em densidades que vão desde infiltrações sutis, detectáveis apenas com anticorpos específicos, até inflamações intensas que são evidentes mesmo por técnicas de coloração histoquímica padrão. Fazendo uma analogia, as neoplasias podem ser comparadas como feridas que nunca cicatrizam, promovendo um constante processo inflamatório e sua presença tem sido associada a várias injúrias teciduais, incluindo fibrose, angiogênese aberrante e neoplasias (Hanahan e Weidenberg, 2011).

De maneira geral, o processo inflamatório pode ativamente promover tumores por fornecer moléculas bioativas ao microambiente tumoral, incluindo fatores de crescimento que sustentam a sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência que limitam a morte celular, fatores proangiogênicos e enzimas modificadoras de matriz extracelular, que facilitam a angiogênese, a invasão e ocorrência de metástase (Thaker et al., 2006; Karnoub e Weinberg, 2007; Lutgendorf et al., 2008; Grivennikov et al., 2010; Qian e Pollard, 2010; Barron et al., 2011; Sakurai e Kudo, 2011).

Em contra partida, a administração de propranolol pode inibir a liberação de fatores pró-inflamatórios e pró-neoplásicos, destacando o potencial valor terapêutico do uso de betabloqueadores como coadjuvantes ao tratamento de pacientes oncológicos (Park et al., 2011; Tang et al., 2013). Por décadas os betabloqueadores têm sido amplamente empregados no tratamento de algumas cardiopatias. Recentemente, estes fármacos têm mostrado implicações significativas na terapia de neoplasias através do bloqueio de adrenoreceptores em tecidos tumorais (Tang et al., 2013).

Fortalecendo os fatos, alguns autores descreveram efeitos benéficos sobre o uso de betabloqueadores em seus estudos *in vitro* como: redução na taxa de proliferação celular e indução de apoptose (Zhang et al., 2009; Yang et al., 2017); redução da proliferação e migração celular (Masur et al., 2001) e da expressão de metaloproteinasas (Guo et al., 2009), redução no desenvolvimento de adenocarcinoma de ductos pancreáticos (Al-wadei et al., 2009) e em linhagens celulares humanas de adenocarcinoma de cólon (HT-29) (Coelho et al., 2015), entre outros.

Nem sempre os estudos *in vitro* podem ser extrapolados para os estudos *in vivo* em seres humanos, no entanto, vários estudos observacionais relatados até o presente momento indicam um crescente número de evidências clínicas sobre o efeito benéfico, pela ação dos betabloqueadores, no controle de várias neoplasias. Powe et al. (2010), verificaram aumento na taxa de sobrevida (71%) e redução de metástase (57%) em mulheres hipertensas portadoras de neoplasia mamária. Ainda, redução na progressão de tumores de mama e na taxa de mortalidade em mulheres com neoplasias mamárias (Barron et al., 2011), e menor recorrência tumoral e mortalidade (Ganz, et al., 2011). De forma similar, redução na progressão tumoral em 90% (De Giorgi et al., 2011) e aumento na sobrevida de pacientes com melanoma maligno (De Giorgi et al., 2012), com neoplasias ovarianas (Diaz et al., 2012), com câncer de cólon em estágios avançados (Engineer, et al., 2013), e melhora do estado imunológico e redução de metástase em diversos modelos tumorais (Benish et al., 2008).

Em medicina veterinária, segundo a revisão de Cintra et al. (2014), as neoplasias mamárias em cadelas assumem como as mais prevalentes neoplasias na fêmea canina, comumente acometem animais entre 7 e 12 anos de idade. O exame histopatológico é o padrão ouro para o diagnóstico, pois permite identificar e classificar o grau de malignidade, a presença de necrose e de invasão linfática e vascular dos tumores mamários (Lana et al., 2007; De Nardi et al., 2009; Cassali et al., 2014). Além das neoplasias, outras doenças adquiridas podem ser observadas em animais de meia idade em diante, de acordo com Camacho et al. (2001) a degeneração mixomatosa da valva mitral ou endocardiose é a cardiopatia mais frequente e acomete animais de raças pequenas com idade média entre 8 e 11 anos.

Assim sendo, como exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do emprego do propranolol sobre a evolução macroscópica dos nódulos mamários em cadelas por meio da paquimetria tumoral e diagnóstico

histopatológico, assim como a monitoração da função cardíaca pelos exames ecocardiográfico, eletrocardiográfico convencional e Holter.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da UNESP Jaboticabal, sob o número de protocolo 008260/17. Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelo tutor do animal, o paciente foi incluso no estudo, cujo delineamento foi prospectivo, randomizado e longitudinal.

Local de realização da pesquisa

O estudo foi conduzido no Laboratório de Cardiologia e nos setores de Oncologia, Obstetrícia e Reprodução Veterinária, Patologia Clínica e Patologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP, Campus de Jaboticabal - SP.

Critérios de seleção dos pacientes

Critérios de Inclusão: portar neoplasia mamária em uma ou mais mamas (≥ 0.5 cm); ser dócil e permitir fácil manejo;

Critérios de exclusão: presença de bradiarritmias e bradicardia, doença pulmonar; azotemia; incapacidade de tratamento dos tutores; doenças sistêmicas e/ou infecciosas.

Não foram excluídas as cadelas portadoras de doenças valvares.

Animais e grupos experimentais

Após atenderem aos critérios anteriormente citados, os animais foram selecionados, de forma randomizada, com o auxílio do site www.random.org, em dois grupos:

✓ **Grupo Placebo (G0):** tratadas apenas com medicação placebo (amido de milho, silicato natural hidratado de magnésio, sílica coloidal, lauril sulfato de sódio, estearato de magnésio), por via oral, a cada 12 horas, durante 30 dias.

✓ **Grupo Propranolol (G1):** tratadas apenas com cloridrato de propranolol (0,20-0,25 mg/kg), por via oral, a cada 12 horas, durante 30 dias.

Os fármacos foram manipulados na farmácia Laví Saúde Animal em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Protocolo experimental

Com o propósito de pesquisar metástases e estadiar os tumores, após o atendimento clínico foram realizados exames laboratoriais (hemograma completo, creatinina, ALT, proteína total e albumina), radiográfico de tórax e ultrassonografia abdominal. Então, no T-00 realizados a mensuração da

pressão arterial sistêmica sistólica em triplicata, exames eletrocardiográficos convencional e Holter, ecocardiograma, paquimetria digital com mensuração tripla (altura x largura x comprimento), repetidos em mais dois intervalos de 15 dias (T-15 e T-30). Após a primeira avaliação (T-00) iniciou-se o tratamento clínico por 30 dias de acordo com cada grupo em questão e, após a terceira avaliação (T-30), foi realizado o procedimento cirúrgico de mastectomia unilateral (cadeia com maior número de nódulos ou com o maior tumor) e a suspensão dos medicamentos em ambos os grupos.

Após a realização do procedimento cirúrgico, os nódulos foram fixados em solução de formalina a 10%, para posterior realização de exame histopatológico.

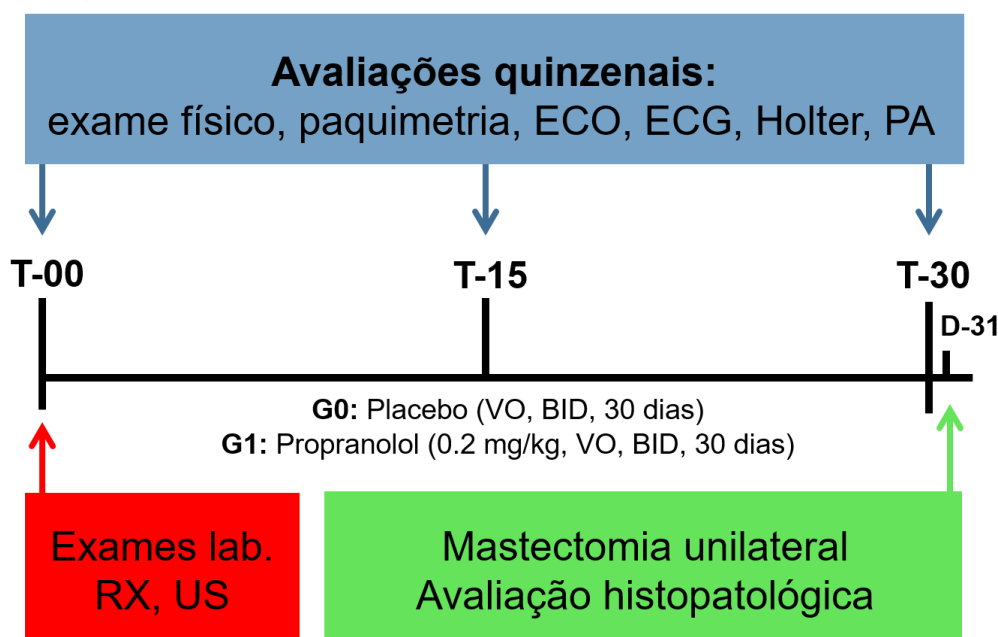


Figura 3. Protocolo experimental ilustrado. Grupo propranolol (G1) e placebo (G0) durante 0 e 15 e 30 dias (tempos T-00, T-15 e T-30, respectivamente); D-31: primeiro dia após a terceira avaliação; ECO: avaliação ecocardiográfica; ECG: avaliação eletrocardiográfica; PA: pressão arterial sistêmica; RX: exame radiográfico; US: exame ultrassonográfico abdominal. UNESP – Jaboticabal (2019).

Aferição da pressão arterial sistêmica (PAS)

A PAS sistólica foi determinada indiretamente pelo método Doppler (Medmega DV 610, Medmega®, Brasil), procurando-se manter o paciente o mais tranquilo possível, conforme recomendado por Brown et al., (2007). As aferições foram realizadas em triplicata, registrando-se a média aritmética das mensurações nos momentos: T-00, T-15 e T-30.

Avaliação eletrocardiográfica

Como recomendado por Tilley, (1992), foi realizada avaliação eletrocardiográfica nas derivações bipolares I, II, III; unipolares aumentadas aVR, aVL e aVF e pré-cordiais rV2, V2, V4 e V10 em um eletrocardiógrafo

computadorizado ECGPC (Versão Veterinária), marca TEB® (Tecnologia Eletrônica Brasileira). Durante a realização do exame, os animais foram mantidos em decúbito lateral direito. Os traçados eletrocardiográficos foram analisados na derivação bipolar II (DII), na velocidade de 50 mm/segundo, sensibilidade N, observando-se as características do ritmo cardíaco e os valores referentes a frequência cardíaca, duração (milissegundos - ms) dos intervalos PR e QT, e características da polaridade da onda T e avaliação da presença ou não de desnivelamento do segmento ST. A avaliação eletrocardiográfica foi realizada em três momentos distintos: T-00, T-15 e T-30.

Avaliação eletrocardiografica holter

Para a captação dos sinais foram utilizados eletrodos adesivos aderidos à superfície da pele devidamente tricotomizada. Dois eletrodos negativos foram posicionados, um sobre a parede torácica direita e outro na região do manúbrio; outros dois eletrodos positivos foram posicionados, sendo um na parede torácica esquerda e o outro sobre a cartilagem xifoide. Foi aplicada bandagem ao tórax dos cães que, posteriormente, receberam coleite para o armazenamento do aparelho gravador digital de três canais (Cardioflash® digital – Cardios Sistemas – São Paulo, Brasil). A partir de então, os animais foram mantidos na instituição por 24 horas com o aparelho.

A análise do ciclo cardíaco foi executada tanto pelo “software” (CardioManenger® S540 – Cardios Sistemas – São Paulo, Brasil) quanto manualmente. O intervalo RR foi considerado normal apenas quando o ritmo foi sinusal. Foi utilizada a VFC no domínio do tempo. Foram avaliados o desvio padrão de todos os intervalos RR (SDNN), o desvio padrão das médias dos intervalos RR obtidos a cada cinco minutos (SDANN), a média dos desvios padrão dos intervalos RR a cada cinco minutos (SDNNIDX), a raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR adjacentes (rMSSD) e a porcentagem de intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50 ms (pNN>50). O estudo foi iniciado no T-00 e repetido em T-15 e T-30.

Avaliação ecocardiográfica

A avaliação ecocardiográfica também foi realizada em três momentos (T-00, T-15 e T-30), as cadelas foram contidas em decúbito lateral para a realização do estudo ecocardiográfico, com o uso do aparelho da marca Siemens®, modelo ACUSON X300, com transdutor de varredura setorial de 1 a 5 MHz e eletrocardiografia simultânea no monitor. O exame compreendeu os modos bidimensional (Modo B), modo movimento (Modo M), Doppler pulsado, contínuo, de fluxo em cores e tecidual. O acesso à janela paraesternal direita foi realizado com o animal posicionado em decúbito lateral direito. A partir da visualização do eixo transversal do ventrículo esquerdo em modo bidimensional, foi obtida a imagem em modo-M, no plano cordal, posicionando o cursor perpendicularmente ao septo interventricular e equidistante dos músculos papilares. A partir dessa imagem foram obtidos os seguintes

parâmetros: espessura do diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole (DIVEd) e em sístole (DIVEs), fração de ejeção (EF) e fração de encurtamento (SF) calculados pelo método de Teichholz; ainda, execução dos planos Aórtico e Pulmonar. Segundo Boon (2011), o estudo do plano Aórtico permite avaliar a presença de remodelamento atrial esquerdo, por meio da relação AE/AO.

Em seguida os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. Para a análise da função diastólica foi utilizado o estudo por meio do Doppler tecidual anular da mitral (septal e lateral) e anular lateral da tricúspide. Para a obtenção do fluxo diastólico mitral, a amostra de volume do Doppler pulsado foi posicionada na altura das bordas comissurais das cúspides com a valva mitral aberta, e o filtro e ganho ajustados para o mínimo possível, compatível com a obtenção de uma boa imagem do espectro do fluxo. Nessa curva, foram analisadas as velocidades máximas da onda E (enchimento rápido do VE) e da onda A (contração atrial), obtendo a relação entre ambas (E/A) (Boon, 2011).

O Doppler tecidual do VE foi obtido a partir do corte apical quatro câmaras com amostra de volume posicionado às margens septal e lateral do anel mitral e tricúspide, para a mensuração das medidas e velocidade tecidual de pico sistólico anular mitral (S_m), a velocidade tecidual na fase de enchimento rápido (E_m) e a velocidade de enchimento na fase de contração atrial (A_m). Porém, puderam ser consideradas para a análise das medidas das velocidades, cada margem (septal e lateral) e também a média dos valores entre septo e parede lateral (Boon, 2011).

Os resultados das mensurações ecocardiográficas foram considerados a partir da média de três ciclos cardíacos consecutivos (Boon, 2011).

Paquimetria e avaliação das neoplasias mamárias.

Foi realizada a mensuração tripla e utilizada a média aritmética dos nódulos mamários com um paquímetro digital nas três dimensões (comprimento, largura e altura) buscando sempre mensurar o maior diâmetro. Também, a partir dos valores em centímetro foi calculado o volume cúbico dos nódulos pela fórmula: $[(\text{altura} \times \text{largura} \times \text{comprimento} \times 3.1416) / 6]$.

Cada nódulo foi considerado como uma unidade experimental, mesmo que presentes em diferentes números entre as cadelas.

Análise estatística.

A análise estatística realizada foi estudo experimental. Os dados foram tabulados e então processados, utilizando os “softwares” R i386 3.4.0. (nódulos) e SAS (avaliação cardíaca), submetidos ao teste de Normalidade (Teste de Cramer-von Mises) e Homocedasticidade (Teste de Levene). Foi realizada análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas no tempo e o Teste de Tukey.

Em todas as análises estatísticas foram consideradas $P < 0,05$ como significativo.

3.RESULTADOS

De um total de 26 cadelas amostradas, 14 atenderam aos critérios de inclusão e exclusão fixados para este experimento, onde, de maneira aleatória, o Grupo 0 (placebo) recebeu 8 cadelas e o Grupo 1 (propranolol) se firmou com apenas 6 representantes. As outras cadelas foram excluídas por apresentarem piometra (n:2), hemoparasitose (n:6), agressividade (n:3) e administração incorreta do fármaco propranolol (n:1). Nenhum dos animais inclusos, de ambos os grupos, apresentou intolerância e/ou efeitos adversos aos fármacos administrados e não foi observada alteração significativa no peso ao longo dos tempos. As cadelas apresentaram idade média de 9 ± 2 anos, peso médio de $7,1\pm 5,8$ kg (Grupo 0) e de $12,3\pm 7,5$ kg (Grupo 1) e sem padrões raciais para ambos os grupos.

Avaliação cardíaca

Em 87,5% dos pacientes do Grupo Placebo (G0) foi observada presença de degeneração mixomatosa da valva mitral, assim como em 83,3% do Grupo propranolol (G1). Segundo o consenso do ACVIM 2009, 75% das cadelas do G0 era classe B1; 12,5% B2 e 12,5% não possuíam insuficiência valvar. Ainda, no G1, 66,6% era B1; 16,7% B2 e 16,7% não possuíam insuficiência valvar.

Não foi observada alteração significativa na pressão arterial sistólica das pacientes.

Os resultados da avaliação ecocardiográfica encontram-se detalhados na Tabela 1. Nessa avaliação, pelo Teste de Tukey, foram observadas alterações significativas na interação entre os grupos x tempos para a relação AE/AO, com aumento da relação ao longo dos tempos para o grupo 1. Observou-se alteração significativa ($p: <,0001$) entre os grupos para as médias do DIVEd, com aumento progressivo das médias dentro do grupo 1.

Sobre a função diastólica do ventrículo esquerdo, pelo método Doppler tecidual, observou-se previamente disfunção diastólica do tipo I em todas as cadelas e, os fármacos utilizados não alteraram esse parâmetro avaliado ao longo dos tempos.

Tabela 1. Parâmetros ecocardiográficos (média±desvio padrão) de fêmeas caninas com neoplasia mamária expostas ao betabloqueio farmacológico com propranolol (G1) e placebo (G0) durante 0 e 15 e 30 dias (tempos T-00, T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2019).

PARÂMETRO	Grupo	MOMENTO			p
		T-00	T-15	T-30	
DIVEd (mm)	G0	25±8 ^{Aa}	24±7 ^{Aa}	24±7 ^{Aa}	0,927
	G1	26±5 ^{Aa}	29±6 ^{Aa}	30±10 ^{Ba}	
DIVEs (mm)	G0	13±6 ^{Aa}	13±5 ^{Aa}	13±6 ^{Aa}	0,178
	G1	17±5 ^{Aa}	17±6 ^{Aa}	18±7 ^{Aa}	
EF (%)	G0	80±7 ^{Aa}	80±8 ^{Aa}	77±9 ^{Aa}	0,765
	G1	75±9 ^{Aa}	75±10 ^{Aa}	73±8 ^{Aa}	
SF (%)	G0	47±7 ^{Aa}	47±7 ^{Aa}	45±9 ^{Aa}	0,633
	G1	43±9 ^{Aa}	43±8 ^{Aa}	42±7 ^{Aa}	
AE/AO	G0	1,40±0,10 ^{Aa}	1,42±0,17 ^{Aa}	1,35±0,14 ^{Aa}	0,017
	G1	1,31±0,13 ^{Aa}	1,47±0,24 ^{Aa}	1,54±0,32 ^{Ab}	
E/A	G0	1,11±0,28 ^{Aa}	1,15±0,19 ^{Aa}	1,22±0,20 ^{Aa}	0,730
	G1	0,92±0,32 ^{Aa}	1,06±0,50 ^{Aa}	1,11±0,48 ^{Aa}	

DIVEd: Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole; **DIVEs:** Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole; **EF:** Fração de ejeção; **SF:** Fração de encurtamento; **AE/AO:** relação do diâmetro do átrio esquerdo com o da Artéria Aorta. **E/A:** relação entre os picos de velocidade das ondas E e A do fluxo transmitral. **p:** valor de p da interação grupo x tempo para ANOVA de médias repetidas. Médias com letras minúsculas iguais não apresentam diferença significativa entre os tempos e, médias com letras maiúsculas iguais não apresentam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey.

Os dados da eletrocardiografia convencional (Tabela 2) não diferiram significativamente na interação dos grupos com os tempos. Entretanto, houve aumento da duração do intervalo QT do G1 na interação do grupo x tempo dentro dos grupos (média dos quadrados mínimos) sendo T-00: 197 ms e T-15: 206 ms e T30: 221 ms, mantendo-se como valores normais de referência para a espécie canina.

Ainda as médias do intervalo PR mostraram diferença significativa (p: <,0001) na interação dos grupo x tempo dentro dos grupos (média dos quadrados mínimos), aumentando o intervalo do grupo 1 ao longo dos tempos, porém mantendo-se dentro dos limites de referência para a espécie em questão.

Contudo, ao exame eletrocardiográfico não se observou alterações no ritmo cardíaco dos pacientes que fizeram uso do cloridrato de propranolol de forma a se correlacionar como possível efeito do fármaco. Porém alguns pacientes, de ambos os grupos, apresentaram mudança de ritmo sinusal para arritmia sinusal respiratória ao longo dos tempos.

Além disso, não foram observadas a presença de supra ou infra desnivelamento do segmento ST nas pacientes avaliadas em ambos os grupos.

Tabela 2 . Parâmetros da eletrocardiografia Convencional (média±desvio padrão) de fêmeas caninas com neoplasia mamária expostas ao betabloqueio farmacológico com propranolol (G1) e placebo (G0) durante 0 e 15 e 30 dias (tempos T-00, T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2019).

PARÂMETRO	Grupo	MOMENTO			p
		T-00	T-15	T-30	
FC mínima (bpm)	G0	110 ± 24 ^{Aa}	103 ± 12 ^{Aa}	99 ± 19 ^{Aa}	0,445
	G1	128 ± 28 ^{Aa}	103 ± 32 ^{Aa}	100 ± 15 ^{Aa}	
FC máxima (bpm)	G0	151 ± 21 ^{Aa}	142 ± 16 ^{Aa}	135 ± 18 ^{Ab}	0,598
	G1	151 ± 28 ^{Aa}	131 ± 31 ^{Ab}	126 ± 28 ^{Ab}	
P (ms)	G0	49 ± 5 ^{Aa}	50 ± 4 ^{Aa}	51 ± 4 ^{Aa}	0,106
	G1	50 ± 4 ^{Aa}	47 ± 4 ^{Aa}	46 ± 4 ^{Aa}	
PR (ms)	G0	85 ± 19 ^{Aa}	88 ± 18 ^{Aa}	87 ± 21 ^{Aa}	0,106
	G1	96 ± 14 ^{Aa}	95 ± 16 ^{Aa}	100 ± 1 ^{Aa}	
QRS (ms)	G0	48 ± 6 ^{Aa}	47 ± 7 ^{Aa}	52 ± 8 ^{Aa}	0,891
	G1	53 ± 10 ^{Aa}	50 ± 5 ^{Aa}	56 ± 6 ^{Aa}	
Qt (ms)	G0	189 ± 23 ^{Aa}	191 ± 20 ^{Aa}	194 ± 20 ^{Aa}	0,083
	G1	197 ± 17 ^{Aa}	206 ± 31 ^{Aa}	221 ± 25 ^{Bb}	
P (mV)	G0	0,28 ± 0,11 ^{Aa}	0,27 ± 0,06 ^{Aa}	0,26 ± 0,10 ^{Aa}	0,951
	G1	0,32 ± 0,05 ^{Aa}	0,31 ± 0,06 ^{Aa}	0,30 ± 0,05 ^{Aa}	
QRS (mV)	G0	1,06 ± 0,33 ^{Aa}	1,05 ± 0,31 ^{Aa}	1,00 ± 0,33 ^{Aa}	0,786
	G1	1,45 ± 0,67 ^{Aa}	1,41 ± 0,59 ^{Aa}	1,33 ± 0,58 ^{Aa}	
T (mV)	G0	0,20 ± 0,16 ^{Aa}	0,13 ± 0,07 ^{Aa}	0,21 ± 0,12 ^{Aa}	0,104
	G1	0,36 ± 0,30 ^{Aa}	0,33 ± 0,30 ^{Aa}	0,28 ± 0,24 ^{Aa}	

FC: frequência cardíaca; **P (ms):** duração de onda P; **PR (ms):** duração de intervalo PR; **QRS (ms):** duração do complexo QRS; **QT (ms):** duração do intervalo QT; **P (mV):** amplitude de onda P; **QRS (mV):** amplitude do complexo QRS; **T (mV):** amplitude da onda T; **p:** valor de p da interação grupo x tempos para ANOVA de médias repetidas. Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey.

Todos os parâmetros avaliados na eletrocardiografia Holter encontram-se expostos na Tabela 3. Nessa avaliação observou-se alteração significativa na interação Grupo x Tempo, pelo Teste de Tukey, sobre a Frequência Cardíaca Média (p:0,004) e o NN médio (p:0,039). Ainda, diferença significativa nas médias da Frequência Cardíaca Mínima (p: <0,0001) e da Frequência Cardíaca Média (p: 0,0076) entre os grupos . Também pode-se observar diferença significativa nas médias dos quadrados mínimos do NN Médio (p: 0,0076) pela interação Grupo x Tempo sobre os Grupos (p: 0,0397). As médias do SDNN, do SDANN, do SDNNIDX e do pNN50 apresentaram diferença significativa entre os grupos (p: <,0001 e <,0001 e 0,0010 e 0,0235, respectivamente).

Tabela 3. Parâmetros da eletrocardiografia Holter [média±desvio padrão ou mediana (mínimo-máximo)] de fêmeas caninas com neoplasia mamária expostas ao betabloqueio farmacológico com propranolol (G1) e placebo (G0) durante 0 e 15 e 30 dias (tempos T-00, T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2019).

PARÂMETRO	Grupo	MOMENTO			p
		T-00	T-15	T-30	
FC mínima (bpm)	G0	40±5 ^{Aa}	40±5 ^{Aa}	42±6 ^{Aa}	0,285
	G1	53±11 ^{Aa}	49±12 ^{Aa}	47±11 ^{Aa}	
FC média (bpm)	G0	89±9 ^{Aa}	91±10 ^{Aa}	99±17 ^{Ab}	0,004
	G1	108±19 ^{Bb}	95±13 ^{Aa}	97±18 ^{Aa}	
FC máxima (bpm)	G0	240±19 ^{Aa}	241±12 ^{Aa}	249±4 ^{Aa}	0,123
	G1	242±17 ^{Aa}	237±18 ^{Aa}	233±27 ^{Aa}	
QRSs	G0	115351±11648 ^{Aa}	114483±25283 ^{Aa}	135395±25645 ^{Aa}	0,328
	G1	135573±47052 ^{Aa}	130405±17879 ^{Aa}	133099±26266233±27 ^{Aa}	
NNs	G0	106167±22165 ^{Aa}	103806±27332 ^{Aa}	122573±24880 ^{Aa}	0,353
	G1	116432±47571 ^{Aa}	126524±18394 ^{Aa}	117305±35246 ^{Aa}	
NN médio	G0	744±73 ^{Aa}	721±85 ^{Aa}	681±151 ^{Aa}	0,039
	G1	616±103 ^{Bb}	681±84 ^{Aa}	680±112 ^{Aa}	
SDNN (ms)	G0	319 (222-345) ^{Aa}	302 (246-399) ^{Aa}	272 (222-404) ^{Aa}	0,440
	G1	223 (139-251) ^{Ba}	268 (156-308) ^{Aa}	220 (140-331) ^{Aa}	
SDANN (ms)	G0	147 (110-271) ^{Aa}	163 (112-343) ^{Aa}	151 (115-261) ^{Aa}	0,130
	G1	129 (54-174) ^{Ba}	105 (77-149) ^{Aa}	147 (62-154) ^{Aa}	
SDNNIDX (ms)	G0	242 (151-213) ^{Aa}	251 (187-298) ^{Aa}	229 (152-362) ^{Aa}	0,210
	G1	177 (124-208) ^{Ba}	230 (128-278) ^{Aa}	183 (122-282) ^{Aa}	
NNNs (ms)	G0	108648 (45278-129358) ^{Aa}	111864 (55067-127580) ^{Aa}	135479 (84071-144080) ^{Aa}	0,337
	G1	104897 (56227-174431) ^{Aa}	119865 (100279-157112) ^{Aa}	114524 (65482-176622) ^{Aa}	
rMSSD (ms)	G0	123 (58-287) ^{Aa}	168(69-216) ^{Aa}	143 (41-199) ^{Aa}	0,395
	G1	157 (90-224) ^{Aa}	134 (49-183) ^{Aa}	150 (46-202) ^{Aa}	
pNN50	G0	69,91 (52,02-79,36) ^{Aa}	67,31 (43,33-79,29) ^{Aa}	60,75 (40,15-86,20) ^{Aa}	0,089
	G1	58,81 (46,4-66,88) ^{Ba}	66,71 (56,12-74,17) ^{Aa}	59,32 (45,79-72,09) ^{Aa}	

FC: frequência cardíaca (bpm- batimentos por minuto); **QRSs:** número de complexos QRS no período de 24 horas; **NNs:** número total de ciclos normais medidos; **NN médio:** média do valor de todos os ciclos normais medidos durante a avaliação; **SDNN:** desvio padrão de todos os intervalos NN; **SDANN:** desvio padrão das médias dos intervalos NN obtidos a cada 5 minutos; **SDNNIDX:** média dos desvios-padrão dos intervalos NN cada 5 minutos; **NNNs:** número normal de três ciclos consecutivos; **rMSSD:** raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos NN adjacentes; **pNN50:** porcentagem de intervalos NN adjacentes com diferença de duração maior que 50 ms. **p:** valor de p da interação grupos*tempos para ANOVA de médias repetidas. Médias com letras minúsculas iguais não apresentam diferença significativa entre os tempos e, médias com letras maiúsculas iguais não apresentam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey.

Avaliação dos nódulos mamários

Foram avaliados 30 nódulos mamários, sendo 15 de cada grupo, estes possuíam volumes distintos variando de 0.03 cm³ a 451.59 cm³, nenhum deles apresentava aderência à musculatura abdominal e nem ulceração cutânea. Em relação à localização dos nódulos nas cadeias mamárias: 2 em M1; 2 em M2; 5 em M3; 12 em M4 e 9 em M5. Optou-se por utilizar apenas as neoplasias

malignas encontradas histopatologicamente, sendo 10 no grupo placebo e 13 no grupo propranolol.

Analisando os tempos do grupo 0 presentes na Tabela 4, observa-se um aumento significativo nas médias do comprimento, da largura, da altura e do logaritmo do volume (p : 0,005; 0,001; 0,003 e 0,001, respectivamente). Os mesmos parâmetros não diferem significativamente dentro do grupo 1.

Tabela 4. Valores médios (média \pm desvio padrão) resultantes de paquimetria digital dos nódulos mamários de fêmeas caninas expostas ao betabloqueio farmacológico com propranolol (G1) e placebo (G0) durante 0 e 15 e 30 dias (tempos T-00, T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2019).

PARÂMETRO	GRUPO 0 (Placebo)	Grupo	MOMENTO			p
			T-00	T-15	T-30	
Comprimento (mm)		G0	30,69 \pm 29,76 ^{Aa}	33,35 \pm 31,00 ^{Bb}	33,69 \pm 31,05 ^{Bb}	0,005
		G1	27,24 \pm 14,98 ^{Aa}	26,67 \pm 15,18 ^{Aa}	26,69 \pm 15,67 ^{Aa}	
Largura (mm)		G0	26,99 \pm 24,57 ^{Aa}	28,28 \pm 25,38 ^{Bb}	29,83 \pm 26,05 ^{Bb}	0,001
		G1	26,76 \pm 14,60 ^{Aa}	24,74 \pm 14,21 ^{Aa}	24,87 \pm 13,80 ^{Aa}	
Altura (mm)		G0	21,25 \pm 22,68 ^{Aa}	23,23 \pm 23,88 ^{Aa}	25,04 \pm 25,02 ^{Bb}	0,003
		G1	21,37 \pm 11,46 ^{Aa}	20,49 \pm 12,37 ^{Aa}	20,66 \pm 12,47 ^{Aa}	
Volume (cm ³)		G0	34,22 \pm 70,14 ^{Aa}	49,61 \pm 105,45 ^{Aa}	62,65 \pm 135,07 ^{Aa}	0,145
		G1	14,72 \pm 22,72 ^{Ba}	13,98 \pm 24,59 ^{Ba}	14,17 \pm 24,52 ^{Ba}	
log Volume (cm ³)		G0	2,41 \pm 1,58 ^{Aa}	2,41 \pm 1,77 ^{Aa}	2,43 \pm 1,88 ^{Ab}	0,001
		G1	2,23 \pm 1,14 ^{Ba}	2,03 \pm 1,18 ^{Ba}	1,96 \pm 1,22 ^{Ba}	

p: valor de p da interação grupos*tempos para ANOVA de médias repetidas. Médias com letras minúsculas iguais não apresentam diferença significativa entre os tempos e, médias com letras maiúsculas iguais não apresentam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey.

A Tabela 5 ilustra a ocorrência das neoplasias malignas avaliadas em cada grupo. Ainda, o volume de cada nódulo de maneira individualizada ao longo dos tempos 0, 15 e 30 dias. O Grupo 0 apresentou diferença significativa (p : 0,0006) nos diferentes tempos em relação ao logaritmo dos volumes individualizados e, no Grupo 1 não foi observada diferença significativa (p : 0,2018). No Grupo 0 observou-se a ocorrência de 70% de carcinomas mamários e no Grupo 1 tem-se 76,9%.

Considerando os tumores malignos, em relação às mudanças de volume nos diferentes grupos, ao longo dos tempos, tem-se um incremento do volume em 90% do Grupo 0 e de apenas 46,15% no Grupo 1.

Tabela 5. Tipos histopatológicos, volume individualizado e estadiamento dos nódulos mamários de fêmeas caninas expostas ao betabloqueio farmacológico com propranolol (G1) e placebo (G0) durante 0 e 15 e 30 dias (tempos T-00, T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2019).

GRUPO 0 (Placebo)	Volume (cm ³)			Estágio
	T-00	T-15	T-30	
Adenomioepitelioma maligno	0,34	0,52	0,52	-
Adenomioepitelioma maligno	165,07	329,19	451,59	-
Carcinoma em tumor misto grau I	0,08	0,11	0,17	II
Carcinoma em tumor misto grau I	0,84	0,89	1,12	I
Carcinoma em tumor misto grau I	12,47	20,65	14,66	IV
Carcinoma em tumor misto grau II	13,05	15,52	18,31	II
Carcinoma em tumor misto grau II	224,00	258,72	282,53	IV
Carcinoma lobular <i>in situ</i>	7,43	8,33	14,31	III
Carcinoma tubular Grau II	3,63	4,25	1,67	I
Carcinossarcoma	50,21	54,41	87,12	-
				p:0,0006
GRUPO 1 (Propranolol)	Volume (cm ³)			Estágio
	T-00	T-15	T-30	
Adenomioepitelioma maligno	26,73	17,84	21,22	-
Adenomioepitelioma maligno	10,55	5,96	6,33	-
Adenomioepitelioma maligno	7,46	6,87	6,75	-
Carcinoma de células escamosas mamário	13,22	7,37	8,37	IV
Carcinoma em tumor misto grau I	0,31	0,36	0,52	III
Carcinoma em tumor misto grau I	86,01	91,27	91,01	III
Carcinoma em tumor misto grau I	3,19	4,00	4,60	I
Carcinoma micropapilar	3,13	3,16	2,95	IV
Carcinoma sólido Grau III	7,00	2,29	1,82	IV
Carcinoma tubular Grau II	33,29	40,61	39,72	IV
Carcinoma tubular Grau II	10,07	10,67	10,56	IV
Carcinoma tubular Grau II	13,22	7,37	8,37	IV
Carcinoma tubular Grau II	3,19	4,00	4,60	I
				p:0,2018

Estadiamento segundo World Health Organization (2011). p: valor de p da interação grupos x tempos para ANOVA de médias repetidas no tempo.

A Figura 1 ilustra a interação das médias do logaritmo do volume dos nódulos mamários de maneira individualizada, onde a linha pontilhada representa o grupo placebo e a linha contínua o grupo propranolol. Observar, na linha pontilhada, o aumento das médias ao longo do tempo e, a redução das médias com a linha contínua ao longo do tempo.

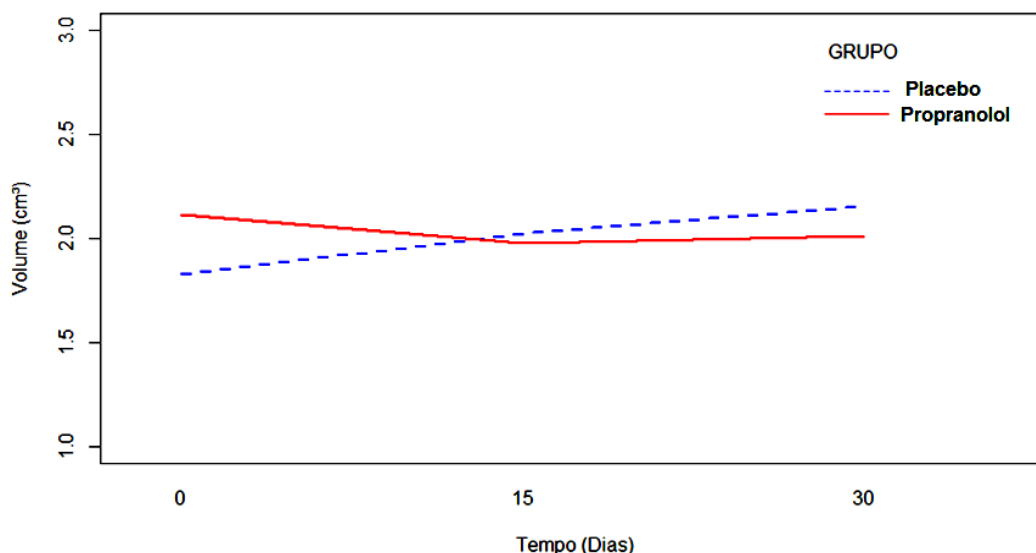


Figura 4. Interação das médias do logaritmo do volume individual dos nódulos mamários em fêmeas caninas expostas ao betabloqueio farmacológico com propranolol (G1) e placebo (G0) durante 0 e 15 e 30 dias (tempos T-00, T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2019).

4.DISCUSSÃO

Este estudo é o primeiro a expor resultados sobre a função miocárdica e a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) em cadelas com neoplasias mamárias. Os resultados mostraram que o efeito do propranolol não apresentou alteração sobre a função cardíaca e no sistema nervoso autônomo, porém, evidenciou efeito sobre o volume das neoplasias mamárias.

Nos últimos anos o efeito dos fármacos betabloqueadores sobre as neoplasias tem sido estudado em humanos (Léauté-Labrèze et al., 2008) e alguns modelos com ratos (Brenish et al., 2008; Sloan et al., 2010; Chen et al., 2018). Nos ensaios clínicos observados na literatura em medicina veterinária geralmente pacientes oncológicos são considerados como critério de exclusão ao se estudar cardiopatias adquiridas, sendo que a população alvo usualmente apresenta endocardiose de mitral associada a neoplasias mamárias por serem doenças em cadelas senis (Camacho, 2001; De Nardi, 2009). Os resultados deste estudo demonstram que o uso do propranolol não produz alterações significativas em relação à função cardíaca desses pacientes, tornando-se indicada a sua utilização em cadelas com tumor mamário acometidas por endocardiose da válvula mitral.

Em relação à função autonômica simpática, ao realizar o bloqueio farmacológico de receptores beta, é esperado observar efeitos cronotrópico, inotrópico e bromotrópico negativos (Bortolotto e Consolim-Colombo, 2009), porém não observados com clareza no presente estudo.

Alguns detalhes que podem indicar esses efeitos são notados nas diferentes modalidades de exames realizados, assim, em relação à

ecocardiografia observou-se aumento na média do DIVEd e da relação AE/AO nas cadelas do Grupo propranolol. Tais achados correlacionam-se com a redução da frequência cardíaca, conseqüente aumento do tempo diastólico, maior enchimento atrioventricular esquerdo (Boon, 2011) e estima-se uma melhor perfusão coronariana, gerando assim efeito benéfico induzido pelo uso do propranolol.

Em relação ao sistema de condução, na eletrocardiografia houve aumento dos intervalos PR e QT nos mesmos pacientes, sendo estes inversamente proporcionais à frequência cardíaca. (Tilley, 1992; Kittleson, 1998). Por sua vez, na eletrocardiografia pelo sistema Holter pode-se observar um aumento dos valores do NN Médio nos animais do Grupo propranolol, sendo este outro parâmetro inversamente proporcional à frequência cardíaca e, o oposto ocorre com os animais do Grupo controle (Ampuero, 2013).

De forma admirável, na rotina clínica pode-se observar que os cães possuem um maior efeito do sistema nervoso autônomo parassimpático em relação ao simpático (Pascon, 2009), sendo que, o efeito do sistema parassimpático prevalece mesmo nos casos de endocardiose da válvula mitral moderada (Oliveira et al., 2012), mantendo a arritmia sinusal respiratória nestes animais (Ampuero, 2013). Uma possível explicação pode estar associada ao fato de que o propranolol realiza bloqueio simpático e não a estimulação parassimpática em si (Bortolotto e Consolim-Colombo, 2009), sendo ainda que os efeitos de dose-resposta e tempo de administração são fatores que necessitam estudos posteriores nesses pacientes.

Além disso, os betabloqueadores não controlam apenas as funções do sistema cardiorrespiratório, mas também, de certa forma, podem controlar várias funções dentro de um organismo como a resposta imunológica através do bloqueio simpático. Segundo Tracey (2002) a íntima relação entre o sistema nervoso e o sistema imunológico possibilitaria controlar a inflamação e vários outros eventos celulares que auxiliam a promoção tumoral e a ocorrência de metástase (Choy et al., 2016).

Apesar de heterogêneos e do número amostral reduzido, os nódulos mamários apresentam comportamento distinto nos diferentes grupos. Pode-se perceber um aumento do volume nas mensurações tridimensionais no Grupo placebo e, uma estagnação ou tendência de redução no Grupo propranolol (Tabela 4). Conforme demonstrado na Tabela 5, os volumes nodulares individualizados, ao longo do tempo e nos diferentes grupos, possuem um comportamento dessemelhante. Observa-se aumento do volume em 90% dos nódulos do grupo placebo e de apenas 46.15% no grupo propranolol, sugerindo a eficácia do betabloqueio farmacológico e redução dos processos de inflamação e dos fatores pró-neoplásicos (Park et al., 2011; Tang et al., 2013). Em contrapartida, os resultados das pesquisas de Shah, et al. (2011) e de Sørensen et al. (2013) descrevem a ausência de efeito significativo do uso de betabloqueadores em pacientes humanos com câncer. Nós especulamos que o fármaco em questão pode ter apresentado eficácia no controle do processo

inflamatório, angiogênese e no controle do microambiente tumoral (Park et al., 2011; Tang et al., 2013; Le et al, 2016). Estudos futuros são necessários para confirmar esse raciocínio através de técnicas imunohistoquímicas.

Corroborando com os resultados de Rasotto et al (2011), a maior taxa de neoplasias mamárias observadas foram os carcinomas, estes presentes em diferentes estágios. Os tumores mamários com estágios III e IV apresentam comportamento biológico mais agressivo, maior taxa de reincidência tumoral e consequentemente prognóstico desfavorável comparado aos estágios I e II (Rasotto et al., 2011). O propranolol apresentou maior efeito sobre o volume dos nódulos classificados como estágio IV, sendo que no grupo recebendo betabloqueador apenas um paciente apresentou aumento de volume (n=1/6) em relação ao grupo placebo (n=2/2) (Tabela 5).

Cabe destacar a significativa redução de volume (7.00 para 1.82 cm³) do carcinoma sólido grau III presente no grupo propranolol, trata-se de uma neoplasia bastante agressiva e com alta taxa de recidiva e indução de metástase como observado em 65% das cadelas no estudo de Rasotto et al (2011). Tal fato pode estar associado a maior ocorrência de eventos celulares (migração, proliferação e invasão), inflamação acentuada e marcada vascularização tumoral quando comparada com neoplasias menos agressivas.

Por fim, em relação ao efeito do propranolol sobre o controle da inflamação e dos eventos celulares deve se levar em conta o tempo de administração (30 dias) e a dose do fármaco (0.20 mg/kg) utilizados neste estudo, ainda, os diferentes comportamentos dos subtipos tumorais (Cardell et al., 2013) . O grupo de Léauté-Labrèze et al. (2008) utilizou a dose de 2 mg/kg durante 252 dias para o tratamento de hemangioma infantil, sendo que na Medicina Veterinária não se evidenciam estudos similares em cadelas com neoplasias mamárias. Estudos seguintes podem elucidar se o controle do volume das neoplasias seria mais intenso se utilizadas doses mais elevadas e administradas por um maior período de tempo.

Como perspectivas futuras o propranolol pode ser indicado como coadjuvante ao tratamento quimioterápico e cirúrgico em pacientes com tumor de mama. O fármaco possui aplicação clínica em medicina veterinária e que, após outros estudos, pode ser implantado como parte do protocolo terapêutico auxiliando os protocolos já consagrados no tratamento das neoplasias em cadelas, visando tornar o câncer uma doença crônica e permitir aumento da longevidade e qualidade de vida.

5.CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que o betabloqueio farmacológico induzido pelo uso do cloridrato de propranolol apresentou controle sobre o volume das neoplasias mamárias em cadelas e sua administração se mostrou segura para função cardíaca e o balanço autonômico dos pacientes analisados.

6.REFERÊNCIAS

AL-WADEI, H. A. N.; AL-WADEI, M. H.; SCHULLER, H. M. Prevention of pancreatic cancer by the beta-blocker propranolol. **Anticancer Drugs**, v. 20, n. 6, p. 1–13, 2009.

AMPUERO, R. A. N. Variabilidade da frequência cardíaca em cães com degeneração mixomatosa crônica da valva mitral. 2013. xiv, 70 p. **Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal**, 2013.

BARRON, T. I.; CONNOLLY, R. M.; SHARP, L.; BENNETT, K.; VISVANATHAN, K. Beta blockers and breast cancer mortality: A population-based study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 19, p. 2635–2644, 2011.

BENISH, M.; BARTAL, I.; GOLDFARB, Y.; LEVI, B.; AVRAHAM, R.; RAZ, A.; BEN-ELIYAHU, S. Perioperative use of β -blockers and cox-2 inhibitors may improve immune competence and reduce the risk of tumor metastasis. **Annals Of Surgical Oncology**, v.15, n. 7, p. 2042–2052, 2008.

BOON, J.A. **Veterinary Echocardiography**. v.2. Wiley-Blackwell, 2011.

BORTOLOTTI, L. A.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. Betabloqueadores adrenérgicos. **Revista Brasileira Hipertensão**, v. 16, n. 4, p. 215–220, 2009.

BROWN, S.; ATKINS, C.; BAGLEY, R.; CARR, A.; COWGILL, L.; DAVIDSON, M.; EGNER, B.; ELLIOTT, J.; HENIK, R.; LABATO, M.; LITTMAN, M.; POLZIN, D.; ROSS, L.; SNYDER, P.; STEPIEN, R. Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 21, p.542-558, 2007.

CAMACHO, A.A. **Aspectos Clínicos Y Fisiopatológicos de la ICC**. In: BELERENIAN,G.C., MUCHA, C.J., CAMACHO, A.A. Afecciones Cardiovasculares en pequeños animales. Inter-médica, Buenos Aires, 2001.

CARDWELL, C. R.; COLEMAN, H. G.; MURRAY, L. J.; ENTSCHLADEN, F.; POWE, D. G. Beta-blocker usage and breast cancer survival : a nested case-control study within a UK Clinical Practice Research Datalink cohort. **International Journal Of Epidemiology**, v. 42, p. 1852–1861, 2013.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; OLIVEIRA, L. O.; SUEIRO, F. A. R.; BESERRA, H. E. O.; BERTAGNOLLI, A. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B.; ARAUJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; MONTEIRO, L. N.; NUNES, F. C.; HORTA, R. S.; REIS, D. C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; MAGALHÃES, G. M.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; TANAKA, N. M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; TERRA, E. M.; SALVADOR, R. C. L.; JARK, P. C.; DELECRODI, J. E. R.; NASCIMENTO, N. A.; SILVA, D. N.; SILVA, L. P.; FERREIRA, K. C. R. S.; FREHSE, M. S.; DI SANTIS, G. W.; SILVA, E. O.; GUIM, T. N.; KERR, B.; CINTRA, P. P.; SILVA, F. B.F.; LEITE, J. S.; MELLO, M. F. V.; FERREIRA, M. L. G.; FUKUMASU, H.; SALGADO, B. S.; TORRES, R. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors – 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Patology**, v. 7, n. 2, p. 38-69, 2014.

CHEN, H.; LIU, D.; GUO, L.; CHENG, X.; GUO, N.; SHI, M. Chronic psychological stress promotes lung metastatic colonization of circulating breast cancer cells by decorating a pre-metastatic niche through activating Beta-adrenergic signaling. **Journal of pathology**, v. 244, p. 49–60, 2018.

CHOY, C.; RAYTIS, J. L.; LEW, M. W. Inhibition of β 2-adrenergic receptor reduces triple-negative breast cancer brain metastases : The potential benefit of perioperative β -blockade Bioinformatic review and analysis. **Oncology Reports**, v. 35, p. 3135–3142, 2016.

CINTRA, P. P.; De PAULA, C. A. T.; CALAZANS, S. G.; SOUZA, J. L.; MAGALHÃES, G. M. Reclassificação e determinação do tipo histológico predominante em neoplasias mamárias caninas do hospital veterinário da universidade de Franca nos anos de 2010 a 2012. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18, p. 2014-2606.

COELHO, M.; MOZ, M.; CORREIA, G.; TEIXEIRA, A.; MEDEIROS, R.; RIBEIRO, L. Antiproliferative effects of β -blockers on human colorectal cancer cells. **Oncology Reports**, v. 33, n. 5, p. 2513–2520, 2015.

DE GIORGI, V.; GANDINI, S.; GRAZZINI, M.; BENEMEI, S.; MARCHIONNI, N.; GEPPETTI, P. Beta-Blockers: a New and Emerging Treatment for Melanoma. **Recenti Progressi In Medicina**, v. 103, n. 1, p. 11–16, 2012.

DE GIORGI, V.; GRAZZINI, M.; GANDINI, S.; BENEMEI, S.; LOTTI, T.; MARCHIONNI, N.; GEPPETTI, P. Treatment With β -Blockers and Reduced Disease Progression in Patients With Thick Melanoma. **Archives of Internal Medicine**, v. 171, n. 8, p. 1–2, 2011.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; ROCHA, N. S.; FERNANDES, S. C. **Neoplasias mamárias**. In: DALECK, C.R; DE NARDI, A.B; RODASKI, S. Oncologia em cães e gatos. 1. ed. São Paulo: Roca, cap. 26, p. 371-383.2009.

DIAZ, E. S.; KARLAN, B. Y.; LI, A. J. Impact of beta blockers on epithelial ovarian cancer survival. **Gynecologic Oncology**, v. 127, n. 2, p. 375–378, 2012.

ENGINEER, D. R.; BURNEY, B. O.; HAYES, T. G.; GARCIA, J. M. Exposure to ACEI/ARB and β -Blockers Is Associated with Improved Survival and Decreased Tumor Progression and Hospitalizations in Patients with Advanced Colon Cancer. **Translational Oncology**, v. 6, n. 5, p. 539–545, 2013.

GANZ, P. A.; HABEL, L. A.; WELTZIEN, E. K.; CAAN, B. J.; COLE, S. W. . Examining the influence of beta blockers and ACE inhibitors on the risk for breast cancer recurrence: Results from the LACE cohort. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 129, n. 2, p. 549–556, 2011.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.

GUO, K.; MA, Q.; WANG, L.; HU, H.; LI, J.; ZHANG, D.; ZHANG, M. Norepinephrine induced invasion by pancreatic cancer cells is inhibited by propranolol . **Oncology Reports Journal**, v. 22, n. 4, p. 825–830, 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer : The Next Generation. **Seminars in Cancer Biology**, v.144, n. 5, p. 1–97, 2011.

KARNOUB, A. E.; WEINBERG, R. A. Chemokine networks and breast cancer metastasis. **Breast Disease**, v. 26, n. 1, p. 75–85, 2007.

KITTLESON, M.D. Eletrocardiography: basic concepts, diagnosis of chamber enlargement, and intraventricular conduction disturbances. In: KITTLESON, M.D; KIENLE, R.D. **Small Animal Cardiovascular Medicine**. St. Louis: Mosby, p.72-94, 1998.

LANA, S. E; RUTTEMAN, G. R; WITHROW, S.J. **Tumors Of The Mammary Gland**. In: WITHROW, S. J; VAIL, D. M. Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 4. ed. Missouri: Saunders Elsevier, cap. 26, p. 619-636, 2007.

LE, C. P.; NOWELL, C. J.; KIM-FUCHS, C.; BOTTERI, E.; HILLER, J. G.; ISMAIL, H.; PIMENTEL, M. A.; CHAI, M. G.; KARNEZIS, T.; ROTMENSZ, N.; RENNE, G.; GANDINI, S.; POUTON, C.W.; FERRARI, D.; MOLLER, A.; STACKER, S. A.; SLOAN, E. K. Chronic stress in mice remodels lymph vasculature to promote tumour cell dissemination. **NATURE COMMUNICATIONS**, v. 7, p. 1–14, 2016.

LÉAUTÉ-LABRÈZE, C.; de la ROQUE, E. D.; HUBICHE, T.; BORALEVI, F.; THAMBO, J.; TAÏEB, A. Propranolol for Severe Hemangiomas of Infancy. **The New England Journal Of Medicine**, v.24, p. 2649–2651, 2008.

LUTGENDORF, S. K.; LAMKIM, D. .; JENNINGS, N. B.; AREVALO, J. M. G. PENEDO, F.; DEGEEST, K., LANGLEY, R. R.; LUCCI, J. A.; COLE, S. W.; LUBAROFF, D. M.; SOOD, A. K. Biobehavioral Influences on Matrix Metalloproteinase Expression in Ovarian Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 21, p. 1–17, 2008.

MASUR, K.; NIGGEMANN, B.; ZANKER, K. S.; ENTSCHLADEN, F. Norepinephrine-induced migration of SW 480 Colon Carcinoma Cells Is Inhibited by B-Blockers. **Cancer Research**, v. 61, n. 13, p. 2866–2869, 2001.

OLIVEIRA, M.S.; MUZZI, R. A. L.; ARAÚJO, R. B.; MUZZI, L. A. L.; FERREIRA, D. F.; NOGUEIRA, R.; SILVA, E. F. Heart rate variability parameters of myxomatous mitral valve disease in dogs with and without heart failure obtained using 24-hour Holter electrocardiography. **Veterinary Record**. V.170, p. 622, 2012.

PAGÈS, F.; GALON, J.; DIEU-NOSJEAN, M. C.; TARTOUR, E.; SAUTÈS-FRIDMAN, C.; FRIDMAN, W. H. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. **Oncogene**, v. 29, p. 1093–1102, 2010.

PARK, S. Y.; KANG, J. H.; JEONG, K. J.; LEE, J.; HAN, J. W.; CHOI, W. S.; KIM, Y. K.; KANG, J.; PARK, C. G.; LEE, H. Y. Norepinephrine induces VEGF expression and angiogenesis by a hypoxia-inducible factor-1 α protein-dependent mechanism. **International Journal of Cancer**, v.128, n. 10, p. 2306–2316, 2011.

PASCON, J. P. da E. Estudo da variabilidade da frequência cardíaca. **Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal**, 2009.

POWE, D. G.; VOSS, M. J.; ZÄNKER, K. S.; HABASHY, H. O.; GREEN, A. R.; ELLIS, I. O.; ENTSCHLADEN, F. Beta-blocker drug therapy reduces secondary cancer formation in breast cancer and improves cancer specific survival. **Oncotarget**, v. 1, n. 7, p. 628–638, 2010.

QIAN, B.; POLLARD, J. W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39–51, 2010.

QIN, J.; JIN, F.; WANG, Y. Adrenergic receptor β 2 activation by stress promotes breast cancer progression through macrophages M2 polarization in tumor microenvironment. **BMB Reports**, v. 48, p. 295–300, 2015.

RASOTTO, R. et al. Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes : An Observational Cohort Study of 229 Cases. **Veterinary Pathology**, v. 20, n. 10, p. 1–8, 2017.

SAKURAI, T.; KUDO, M. Signaling pathways governing tumor angiogenesis. **Oncology**, v.81, n. 1, p. 24–29, 2011.

SHAH, S. M.; CAREY, I. M.; OWEN, C. G.; HARRIS, T.; DEWILDE, S. COOK, D. G. Does beta-adrenoceptor blocker therapy improve cancer survival? Findings from a population-based retrospective cohort study. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 157–161, 2011.

SLOAN, E. K.; PRICEMAN, S. J.; COX, B. F.; YU, S.; MATTHEW, A.; TANGKANANGNUKUL, V.; AREVALO, J. M.; MORIZONO, K.; BREANNE, D. W.; WU, L.; SOOD, A. K.; COLE, S. W. Sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer. **Cancer Research**, v. 70, n. 18, p. 7042–7052, 2010.

SØRENSEN, G. V.; GANZ, P. A.; COLE, S. W.; PEDERSEN, L. A.; SØRENSEN, H. T.; CRONIN-FENTON, D. P.; GARNE, J. P.; CHRISTIANSEN, P. M.; LASH, T. L.; AHERN, T. P. Use of β -Blockers, Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors, Angiotensin II Receptor Blockers, and Risk of Breast Cancer Recurrence: A Danish Nationwide Prospective Cohort Study. **Journal Of Clinical Oncology: Official Journal Of The American Society Of Clinical Oncology**, v. 31, n. 18, p. 2265–2272, 2013.

SZELÉNYI, J.; KISS, J. P. ; SZELÉNYI, M.; VIZI, E. S. Contribution of Differently Localized alpha 2 and beta-adrenoceptors in the Modulation of TNF- α and IL-10 Production in Endotoxemic Mice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, n. 145, p. 145–153, 2000.

TANG, J.; LI, Z.; LU, L.; CHO, C. H. β -Adrenergic system , a backstage manipulator regulating tumour progression and drug target in cancer therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v.23, n. 6, p. 533–542, 2013.

THAKER, P. H.; HAN, L. Y.; KAMAT, A. A.; AREVALO, J. M.; TAKAHASHI, R.; LU, C.; JENNINGS, N. B.; ARMAIZ-PENA, G.; BANKSON, J. A.; RAVOORI, M.; MERRITT, W. M.; LIN, Y. G.; MANGALA, L. S.; KIM, T. J.; COLEMAN, R. L.; LANDEN, C. N.; LI, Y.; FELIX, E.; SANGUI, A. K. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. **Nature Medicine**, v. 12, n. 8, p. 939–944, 2006.

THAKER, P. H.; SOOD, A. K. The Neuroendocrine Impact of Chronic Stress on Cancer Premal. **Seminars in Cancer Biology**, v. 18, n. 3, p. 164–170, 2008.

TILLEY, L. P. Essentials of canine and feline electrocardiography. 3. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v.420, n. 6917, p. 853–859, 2002.

TRACEY, KEVIN J.; FONG, Y.; HESSE, D. G.; MANOGUE, K. R.; LEE, A. T.; KUO, G. C.; LOWRY, S. F.; CERAMI, A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. **Nature**, v. 330, n. 6149, p. 662–664, 1987.

WANG, H.; BLOOM, O.; ZHANG, M.; VISHNUBHAKAT, J. M.; OMBRELLINO, OM.; FRAZIER, A.; YANG, H.; IVANOVA, S.; BOROVIKOVA, L.; MANOGUE, K. R.; FAIST, E.; ABRAHAM, E.; ANDERSSON, J.; ANDERSON, U.; MOLINA, P. E.; ABUMRAD, N. N.; SAMA, A.; TRACEY, K. J. HMG-1 as a Late Mediator of Endotoxin Lethality in Mice. **Science**, v. 285, p. 248–251, 1999.

ZHANG, D.; MA, Q.; SHEN, S.; HU, H. Inhibition of Pancreatic Cancer Cell Proliferation by Propranolol Occurs Through Apoptosis Induction. The Study of A-Adrenoceptor Antagonist's Anticancer Effect in Pancreatic Cancer Cell. **Pancreas Journal Of Neuroendocrine Tumors And Pancreatic Diseases And Sciences**, v. 38, n. 1, p. 94–100, 2009.