

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

**PESQUISA DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS EM MEDULA
ÓSSEA DE CADELAS COM TUMOR DE MAMA**

Talita Beani Corsini
Médica Veterinária

2019

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

**PESQUISA DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS EM MEDULA
ÓSSEA DE CADELAS COM TUMOR DE MAMA**

Talita Beani Corsini

Orientadora: Profa. Dra Rosemeri de Oliveira Vasconcelos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Medicina Veterinária (Patologia Veterinária)

2019

C826p	Corsini, Talita Beani Pesquisa de células neoplásicas em medula óssea de cadelas com tumor de mama / Talita Beani Corsini. -- Jaboticabal, 2019 51 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Rosemeri de Oliveira Vasconcelos 1. Medula óssea. 2. Neoplasias. 3. Mamas. 4. Cão. I. Título.
-------	--

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

Essa ficha não pode ser modificada.

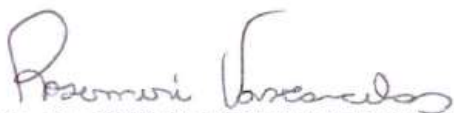
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PESQUISA DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS EM MEDULA ÓSSEA DE CADELAS COM TUMOR DE MAMA

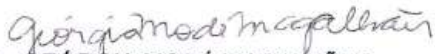
AUTORA: TALITA BEANI CORSINI

ORIENTADORA: ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. GEÓRGIA MODÉ MAGALHÃES
Curso de Medicina Veterinária / Instituto Federal do Sul de Minas / Muzambinho/MG



Profa. Dra. MAYARA CAROLINE RO SOLEM
FAFRAM / Ituverava/SP

Jaboticabal, 19 de julho de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TALITA BEANI CORSINI – nascida em 26 de outubro de 1987, natural da cidade de Ribeirão Preto, estado de São Paulo. Iniciou sua graduação no curso de Medicina Veterinária no ano de 2009, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, tendo finalizado a mesma em dezembro de 2013. Coursou o Programa de Residência em Área Profissional da Saúde, na Área de Concentração Medicina Veterinária e Saúde na mesma instituição, no período de 01 de março de 2014 a 29 de fevereiro de 2016. Em 2017 ingressou no Programa de Graduação (Mestrado) em Medicina Veterinária da mesma Instituição, sob orientação da Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos. Atualmente atua como Médica Veterinária responsável pelo Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias – LACVET, localizado na cidade de Ribeirão Preto/SP.

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes”
(Isaac Newton)

Dedico este trabalho aos seres mais especiais: os animais. Em especial aos meus “filhos peludos” Fluck (que agora é uma estrelinha no céu), Toquinho e Kikita, por me ensinarem, a cada dia, o verdadeiro sentido da palavra amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me proporcionar a vida e trilhar meus caminhos, dando-me saúde, proteção, sabedoria, força e determinação para alcançar meus objetivos.

Agradeço aos meus pais, João Carlos e Marilda e a minha irmã Cristiane, por serem meus alicerces, pelo amor incondicional e por todo apoio e incentivo. Obrigada por sempre estarem ao meu lado.

Agradeço aos meus avós por me darem indiretamente, através dos ensinamentos que deram aos meus pais, minhas maiores heranças: a honestidade e o caráter. Vocês sempre serão meus exemplos de que, com perseverança, esforço, trabalho e principalmente dignidade conseguimos chegar onde queremos.

Agradeço ao Fred, meu melhor amigo, marido e eterno namorado!! Obrigada por nunca negar esforços em me ajudar, por estar sempre ao meu lado, por todo o incentivo e amor!!

Não poderia deixar de agradecer a minha eterna tia Marley. Você foi embora muito cedo, mas sei que continua cuidando de nós do lugar onde está, assim como fazia enquanto estava aqui. Obrigada por ter sido tão presente em todos os momentos da minha vida, inclusive neste!!

Agradeço a todos os meus amigos que, mesmo estando longe, sempre estão perto. Vocês tornam a vida mais leve e divertida!!

Agradeço aos meus companheiros do Departamento de Patologia Animal, Paulo, Gabi, Lê, Julio, por toda a ajuda no meu experimento, assim como meus amigos Fabi, Tiago, Murillo, Christian, por toda ajuda no experimento. Muito obrigada, sem vocês não teria sido possível!!

Agradeço ao Técnico do laboratório, Antônio, por toda paciência e ajuda com a montagem das lâminas. Obrigada por sempre ter me ajudado, com um sorriso no rosto, mesmo nos dias que eu chegava afobada querendo as lâminas “para ontem”.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, por aceitar me orientar mesmo com as minhas dificuldades em estar em Jaboticabal. Obrigada por ser muito mais que minha orientadora. A senhora é um grande exemplo para todos nós.

Agradeço também a todos os animais, que apesar de não falarem, demonstram no olhar o sentimento de gratidão.

Por fim, agradeço a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, UNESP – Jaboticabal, pelo acolhimento e pela minha formação durante esses 10 anos. Com certeza nosso vínculo será eterno!!

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	5
1 – Introdução	5
2 – Revisão de literatura	7
2.1 – Glândulas Mamárias	7
2.2 – Neoplasia de glândulas mamárias	7
2.3 – Micrometástase em Medula Óssea	11
3 – Referências	15
CAPÍTULO 2 – PESQUISA DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS EM MEDULA ÓSSEA DE CADELAS COM TUMOR DE MAMA	22
Resumo	22
Introdução	23
Material e Métodos	24
Animais utilizados	24
Colheita do material	24
PCR	25
Mielograma	25
Análise Histopatológica	25
Análise Imunohistoquímica	26
Análise Estatística	27
Resultados	27
Discussão	28
Conclusão	32
Referências	34



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 histopatológica e imunohistoquímica de medula óssea em cadelas com tumor de mama**", protocolo nº 008381/17, sob a responsabilidade do Prof^ª. Dr^ª. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, 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	01/08/2017 a 06/08/2019
Espécie / Linhagem	Canina
Nº de animais	30 animais
Peso / Idade	10 – 30 kg / 5 – 15 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Rotina do Hospital Veterinário FCAV/UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 01 de junho de 2017.


Prof^ª Dr^ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

PESQUISA DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS EM MEDULA ÓSSEA DE CADELAS COM TUMOR DE MAMA

RESUMO - A glândula mamária é o segundo sítio mais comum de desenvolvimento tumoral em cadelas. Uma das formas de estadiamento destes tumores é avaliar a presença ou ausência de metástase à distância, inclusive na medula óssea. Este achado, na Medicina, associa-se a baixa sobrevida de mulheres com tumores mamários, porém na Medicina Veterinária esse estadiamento clínico é mais utilizado para pacientes com linfomas e mastocitomas. Estudos que utilizem a biópsia de medula óssea como método de pesquisa de estadiamento em tumores mamários são escassos. Desta forma o presente estudo teve como objetivo avaliar lesões mamárias e a medula óssea de 36 cadelas, buscando-se células tumorais disseminadas ou focos metastáticos. Para isso realizou-se a análise histopatológica dos tumores de mama, linfonodos e medula óssea dessas cadelas, corados com Hematoxilina e Eosina. Na medula óssea também foram utilizadas a coloração com Tricrômio de Masson, para avaliação de fibrose medular, e a imunohistoquímica, para a pesquisa de micrometástase. O carcinoma em tumor misto grau I fora o mais observado (18,08%), não havendo diferença estatística com relação ao tamanho tumoral e a presença de metástase em linfonodos. Na medula óssea de uma cadela com carcinossarcoma (4,35%) houve marcação citoplasmática de uma provável célula tumoral disseminada, de origem epitelial, com o anticorpo citoqueratina-19 pela imunohistoquímica. Nenhuma das cadelas que apresentou diminuição da celularidade ou fibrose medular (Tricrômio de Masson) ou tiveram marcação celular para citoqueratina. Conclui-se então que a avaliação da medula óssea pode ser utilizada como um método de estadiamento do tumor de mama em cadelas, pois células tumorais disseminadas apresentam potencial de se tornarem lesões secundárias bem como se disseminarem para focos distantes, causando metástases terciárias num período de tempo indeterminado.

Palavras-chave: biópsia medular, cão, citoqueratina, micrometástase, neoplasia mamária

RESEARCH OF NEOPLASTIC CELLS IN BONE MARROW OF BITCHES WITH BREAST TUMOR

ABSTRACT - The mammary glands are the second most common site of tumour development in female dogs. One way of staging these tumours is evaluate the presence or absence of distant metastasis, including those in the bone marrow. In Medicine, this finding is associated with the low survival of women with breast tumours, but in Veterinary Medicine this clinical staging is more used for patients with lymphomas and mast cells tumours. Studies using bone marrow biopsy as a method of staging research in breast tumours are scarce. Thus, the present study aimed to evaluate mammary lesions of 36 female dogs, as well as the bone marrow of them, searching for disseminated tumour cells or metastatic foci. For this, we performed histopathological analysis of mammary gland tumours, lymph node and bone marrow of these dogs, stained with Hematoxylin and Eosin. The Masson's trichrome staining was also used for the evaluation of bone marrow fibrosis and immunohistochemical technique for a micrometastasis research. Carcinoma in grade I mixed tumour was the most observed (18.08%), with no statistical difference between tumour size and lymph-node metastasis. In the bone marrow of a bitch with carcinosarcoma (4.35%) a probable disseminated tumor cell of epithelial origin was found using cytokeratin-19 antibody by immunohistochemistry technique. None of the female dogs presented decreased cellularity or bone marrow fibrosis (Masson's trichrome) or had cell labeling for cytokeratin. It is concluded that bone marrow evaluation can be used as a method of staging mammary tumour in female dogs, since disseminated tumor cells have the potential to become secondary lesions as well as spread to distant foci, causing tertiary metastases in an undetermined period of time.

Keywords: medular biopsy, female dog, cytokeratin, micrometastase, mammary neoplasm

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. Introdução

Uma das características dos mamíferos é a presença de glândulas mamárias, que são observadas tanto em machos quanto em fêmeas (NOGUEIRA; CASTRO, 2017). Elas são o segundo sítio mais comum de desenvolvimento tumoral em cães (PETROV et al., 2014), correspondendo a 42% dos tumores diagnosticados segundo Sorenmo (2003) e a 52% segundo Queiroga e Lopes (2002). Figuera et. al (2008) observaram que dos 4.844 cães necropsiados no período de 1965 a 2004, 378 foram em decorrência de neoplasias, sendo as neoplasias mamárias malignas as principais.

A classificação histopatológica do tumor mamário é importante, pois prediz o comportamento biológico do mesmo (BOSTOCK, 1986). Segundo Cassali et al. (2014), os tumores mamários podem ser classificados histologicamente como alterações hiperplásicas, displásicas, benignas ou malignas epiteliais e malignas mesenquimais.

As metástases dos tumores mamários ocorrem mais comumente pela via linfática, mas também podem ocorrer pela via sanguínea (NUNES et al., 2017). De acordo com Petrov et al. (2014), o diagnóstico tardio é um dos principais problemas que resulta na morte do animal, principalmente devido à metástase pulmonar.

Estudos demonstram que mulheres podem apresentar micrometástases de carcinoma mamário em medula óssea, estando isso associado a baixa sobrevida da paciente (BRAUN et al., 2005). Para a avaliação da medula óssea, utiliza-se o mielograma, o qual preserva as características citológicas das células hematopoiéticas (COWELL et al., 2009; RASKIN; MEYER, 2011), e também a biópsia medular, que é mais indicada quando se busca a presença de comprometimento neoplásico (ALVES, 2009).

Frente ao exposto, o presente estudo objetivou avaliar a medula óssea de cadelas com tumor de mama, por meio da observação de sua morfologia celular e arquitetura tecidual, por meio do mielograma e da biópsia medular respectivamente. Adicionalmente, a presença de mielofibrose foi verificada pela técnica do Tricômio de Masson. Além disso, buscou-se procurar células tumorais

epiteliais a fim de se comprovar a presença de micrometástase medular de carcinoma mamário, por meio da técnica de imunohistoquímica com a utilização do anticorpo citoqueratina-19.

2. Revisão de literatura

2.1 Glândula mamária

Uma das características dos mamíferos é a presença de glândulas mamárias, que são glândulas sudoríparas apócrinas modificadas e que estão presentes tanto em machos quanto em fêmeas (NOGUEIRA; CASTRO, 2017). Nas cadelas, essas glândulas localizam-se na face ventral do tórax até a região inguinal, com um número médio de cinco pares (podendo variar de 4 a 6 pares) e são classificadas como torácica cranial, torácica caudal, abdominal cranial, abdominal caudal, e inguinal (NOGUEIRA; CASTRO, 2017). Cada glândula é formada por um corpo e uma papila mamária, sendo revestida externamente por pele abdominal. Abaixo da epiderme encontra-se a hipoderme, que é a responsável pela formação do tecido adiposo pericapsular que envolve cada glândula, estando o parênquima glandular distribuído no interior de formações conjuntivas de sustentação (NOGUEIRA & CASTRO, 2017).

A drenagem linfática das mamas torácicas cranial e caudal é feita para o linfonodo axilar, das abdominal caudal e inguinal para o linfonodo inguinal e da glândula abdominal cranial pode ser feita tanto para o linfonodo axilar quanto para o inguinal (NOGUEIRA; CASTRO, 2017).

2.2 Neoplasia de glândulas mamárias em cadelas

A glândula mamária é o segundo sítio mais comum de desenvolvimento tumoral em cães (PETROV et al., 2014), correspondendo a 42% dos tumores diagnosticados segundo Sorenmo (2003) e a 52% segundo Queiroga e Lopes (2002), sendo a pele o principal sítio de desenvolvimento de tumores em cães (PETROV et al., 2014). Segundo Queiroga & Lopes (2002), aproximadamente 50% dos tumores mamários diagnosticados em fêmeas caninas são malignos. Já Filho et al. (2010) observaram que dos 1.465 tumores computados no estudo, 1.075 (73,4%) eram malignos. A maioria dos animais acometidos apresentam situação clínica saudável no momento em que o tumor é observado, seja pelo tutor ou pelo médico veterinário durante o exame clínico de rotina (CASSALI et al., 2014). Porém, os animais que não chegam clinicamente bem, apresentam

sinais clínicos inespecíficos como apatia, cansaço, tosse, emagrecimento, diarreia, vômito, poliúria e polidipsia (RIBAS et al., 2012).

Podem ser acometidas fêmeas caninas de meia idade a senis, sexualmente ativas ou castradas (CASSALI et al., 2014), sendo as cadelas senis não castradas antes do primeiro cio as mais susceptíveis (SORENMO, 2003; GUNDIM et al., 2016). Dalek et al. (1998) observaram em seus estudos que fêmeas caninas de raças puras apresentam maior risco de desenvolver tumores mamários. Já Kim et al. (2016) observaram diferenças tanto relacionadas a raça quanto a idade em fêmeas caninas com carcinoma mamário, sendo as da raça Shih-Tzu com idade mais avançada as notadamente mais afetadas. Tais observações são contraditas por Gundim et al. (2016), os quais afirmam não haver predisposição racial para o desenvolvimento dos tumores mamários.

Menos de 1% de cães machos apresentam risco de desenvolver tumor mamário quando comparado às fêmeas (FILHO et al., 2010), estando esses casos geralmente associados a distúrbios hormonais, principalmente relacionados ao estrógeno. Porém, Kwon et al. (2017) ao avaliarem um cão macho da raça Cocker Spaniel, com adenocarcinoma mamário de alto grau e tumor de células de Leydig, sugeriram que ambos os tumores podem não estar relacionados ao hormônio sexual feminino, pois os receptores de estrógeno e progesterona tiveram uma expressão imunohistoquímica limitada em células da glândula mamária e do testículo.

Um dos principais fatores de risco relacionado ao desenvolvimento dos tumores mamários em cadelas é a exposição prolongada e intensa do tecido mamário aos hormônios sexuais, principalmente o estrógeno, a prolactina e a progesterona (NUNES et al., 2017). A castração precoce até o segundo estro da cadela é considerada uma forma de prevenção, assim como a não administração de hormônios contraceptivos e/ou abortivos (NUNES et al., 2017). A ovariectomia é a melhor maneira de prevenção dos tumores de mama, pois os esteroides produzidos nos ovários apresentam papel importante na etiologia da doença (PETROV et al., 2014). A castração das fêmeas reduz para 0,5% a incidência destas neoplasias quando realizada antes do primeiro cio, aumentando para 8% após o primeiro cio, 26% após o segundo cio e não havendo efeito em cadelas castradas após os dois anos e meio de idade (FERGUSON, 1985).

As neoplasias mamárias em cadelas geralmente apresentam-se na forma de nódulos circunscritos de tamanho, consistência e mobilidade variáveis em pele e musculatura, podendo ou não haver reações inflamatórias locais e ulceração epitelial (CASSALI et al., 2014). Os pares de glândulas mais comumente acometidos são abdominal caudal e inguinal, sendo os primeiros mais afetados quando há estímulos hormonais ou traumas ocasionados pelo próprio animal (DALEK et al., 1998). Donnay et al. (1995) associam a maior ocorrência de tumores nas mamas inguinais ao fato de haver maior quantidade de receptores hormonais de estrógeno e progesterona nas mesmas, quando comparadas às outras mamas. Filho et al. (2010) associaram essa maior ocorrência de tumores nas mamas abdominal caudal e inguinal, provavelmente devido a maior quantidade de parênquima mamário nessa região.

A classificação histopatológica do tumor mamário é importante, pois prediz o comportamento biológico do mesmo (BOSTOCK, 1986). Segundo Cassali et al. (2014), os tumores mamários podem ser classificados como lesões epiteliais não neoplásicas, tumores benignos e tumores malignos. Filho et al. (2010), em estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães, observaram que as neoplasias malignas foram mais prevalentes que as benignas e que o carcinoma simples foi o tipo histológico mais prevalente. Segundo CASSALI (2013), os tumores mistos são os tumores mamários mais frequentemente encontrados em cadelas.

O estadiamento clínico dos tumores mamários em cadelas é determinado de acordo com o sistema TNM, estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) sendo: T: tamanho do tumor T1: menor que 3 cm; T2: entre 3 e 5 cm; T3: maior que 5 cm; N: propagação para linfonodo regional (N0: ausente; N1: presente); M: presença de metástase à distância (M0: ausente; M1: presente). Com isso, Cassali et al. (2014) classificaram os tumores em cinco estágios: I (T1/N0/M0); II (T2/N0/M0); III (T3/N0/M0); IV (T1,2,3/N1/M0); V (T1,2,3/N0,1/M1). Ferreira et al. (2009) observaram em seus estudos que a maioria dos tumores classificados como T3 eram malignos e com maior taxa de proliferação, quando comparados à tumores classificados como T1 ou T2.

O diagnóstico do tipo de lesão mamária é fornecido pelo exame histopatológico da glândula afetada, a partir de biópsia excisional da mesma. Todavia, a citopatologia aspirativa deve ser um método de triagem associado,

que vem sendo amplamente utilizado na Medicina Veterinária, pois apresenta vantagens como baixo custo, rapidez e pouca invasividade (COLODEL et al., 2010), uma vez que permite a distinção entre lesões neoplásicas e inflamatórias, hiperplásicas ou degenerativas, o que direciona a conduta terapêutica precocemente (COLODEL et al., 2010).

O tratamento mais indicado para cadelas com tumor de mama é a remoção cirúrgica de toda a glândula mamária, com exceção dos casos em que os tumores são inoperáveis ou nos casos de carcinoma inflamatório, utilizando então tratamentos adjuvantes como radioterapia e quimioterapia (PETROV et al., 2014). Além da excisão cirúrgica, a quimioterapia é associada nos casos em que a doença se encontra num estágio avançado, com invasão em vasos sanguíneos, linfáticos, ou metástase regional e a distância (NOVOSAD, 2003).

As metástases são a principal causa de óbito em cães com tumor de mama, sendo que as células tumorais invadem vasos sanguíneos ou linfáticos ao redor do tumor e migram para o linfonodo, através da via linfática, ou para órgãos distantes, através da via hematógena, as chamadas células tumorais circulantes (CTC's) (COSTA et al., 2011). Sorenmo (2003) observou que animais com metástase em linfonodo regional possuem uma expectativa de vida menor, porém a presença de metástase à distância torna o prognóstico ainda pior, quando comparado à presença de metástase apenas em linfonodo regional. De acordo com Petrov et al. (2014), o diagnóstico tardio é um dos principais problemas que resulta no óbito do animal, principalmente devido à metástase pulmonar.

Algumas das formas de avaliação da presença ou ausência de metástase à distância são através da radiografia torácica para avaliação pulmonar, uma vez que os pulmões são os principais sítios de metástase em casos de tumores mamários malignos, e a ultrassonografia abdominal para a avaliação de metástase em outros órgãos, como por exemplo, fígado e baço. Lesões metastáticas menores de 6 mm podem ser precocemente detectadas pela tomografia computadorizada (CASSALI et al., 2014).

Alguns carcinomas do trato respiratório e de glândula mamária podem ser detectados por meio da técnica de imunohistoquímica utilizando-se anticorpos como a citoqueratina 5, 6, 7, 8, 18, 19 (MOLL et al., 1983). Grande parte dos adenocarcinomas mamários primários ou metastáticos, lobulares ou ductais são

positivos na marcação com a citoqueratina-7 (TOT, 1999). Tal marcação deve-se ao fato de que as células epiteliais serem caracterizadas pela presença de grupos específicos de filamentos intermediários, as chamadas citoqueratinas, que constituem uma família de pelo menos 20 diferentes tipos de polipeptídeos expressos em vários epitélios (CHU; WEISS, 2002). Costa et al. (2011) utilizou um painel com 16 marcadores humanos de células tumorais circulantes para detectar células de carcinomas caninos em sangue periférico e observaram que dentre eles, a citoqueratina-19 foi capaz de detectar de forma sensível uma célula a cada 10^7 leucócitos.

2.3 Micrometástases em Medula Óssea

Desde 1935 existem relatos, na medicina, envolvendo a infiltração de tumores sólidos na medula óssea de humanos (REICH, 1935). Ellis et al. (1964) observou 25 casos de tumores metastáticos na medula óssea de um total de 1.445 biópsias realizadas. Já Jonsson e Rundles (1951) observaram 71 casos de infiltração de tumores não hematológicos na medula óssea de 152 pacientes, sendo os tumores mais encontrados os carcinomas de próstata, pulmão, mama, estômago e neuroblastoma. Fato também observado por Singh et al. (1976) que encontraram metástase em medula óssea de 101 dos 6.500 pacientes avaliados. Delta e Pinkel (1964) observaram 28 casos de infiltração por neuroblastoma, rabdomiossarcoma, osteossarcoma e sarcoma de Ewing em 79 aspirados de medula óssea de crianças. Na Medicina Veterinária estudos mais recentes vêm sendo desenvolvidos e comprovam que cães e gatos também podem apresentar micrometástases em medula óssea (HENSON et al., 1998; MISCHKE et al., 2003; ESPINOSA DE LOS MONTEROS et al., 2003; JAILLARDON et al., 2012; WHEISHAAR et al., 2014; PIANE et al., 2014).

A sobrevivência das células tumorais na medula óssea dá-se devido ao seu microambiente, onde são encontrados fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que promovem sua proliferação e sobrevivência (CHANTRAIN et al., 2008; OLIVEIRA, 2009; STEFANOVIC et al., 2013; WALKER et al., 2016). Ao se ajustarem a esse novo microambiente, essas células tumorais comunicam-se com as células tronco mesenquimais e atraem outras células, como por exemplo macrófagos e elas, juntamente com as células estromais de suporte

hematopoiético formam próximo ao endósteo, comunicações intercelulares (WALKER et al., 2016). Essa proximidade ao endósteo deve-se principalmente ao fato de ser essa uma região mais hipóxica da medula óssea, o que pode induzir as células tronco cancerígenas a entrarem em dormência, podendo contribuir com a quimioresistência e com a malignidade das mesmas (WINKLER et al., 2010; TRIPATHI et al., 2014). As células tronco mesenquimais, além de propriedades imunossupressoras, participam do processo de dormência das células tumorais, permitindo a sobrevivência das mesmas (CHATURVEDI et al., 2014).

A proliferação lenta, associada com sinais apoptóticos que resultam na estagnação do tamanho do tumor, somada à manutenção das células tumorais na fase G0/G1 do ciclo celular resultam na quiescência dessas células provenientes do tumor de mama, as quais podem, em um tempo indeterminado, tornarem-se recorrentes e causarem metástase para sítios terciários (ZHANG et al., 2013). Dessa maneira, a habilidade das células do tumor de mama de terem a medula óssea como um dos principais sítios metastáticos, confere a elas proteção, especialmente às quiescentes, pois conseguem evadir de agentes tóxicos anti-cancerígenos, uma vez que inúmeros quimioterápicos requerem que as células cancerígenas se proliferem rapidamente para que tenham efeito (DIEL et al., 1992; AGUIRRE-GHISO, 2007). Esse tipo de proteção pode ser observado em pacientes que tiveram o tumor primário removido, passaram por tratamento com terapias adjuvantes e, após 36 meses, foram identificadas células tumorais em aspirados de medula óssea (DIEL et al., 1992).

Quando presentes na medula óssea, as células tumorais promovem um desbalanço homeostático entre a osteogênese e a osteólise, transformam o microambiente e recrutam células precursoras da própria medula óssea, as quais caem na circulação, migram até o tumor primário e contribuem para a reação inflamatória e formação de neovascularização, o que influencia a progressão tumoral (COUSSENS; WERB, 2002; CHANTRAIN et al., 2008; STEFANOVIC et al., 2013).

A medula óssea parece ser um órgão que atua como reservatório de células tumorais que foram separadas do tumor primário e se espalharam para outras localizações anatômicas através da circulação sanguínea, as chamadas células tumorais disseminadas (CTD's). Essas células, na medula óssea, podem

sofrer apoptose, entrar num estado de dormência ou voltar à corrente sanguínea e atingir órgãos distantes (PANTEL; BRAKENHOFF, 2004; AGUIRRE-GUIISO, 2007; GORGES; PANTEL, 2013). A presença de CTD's na medula óssea está associada a menores chances de cura e consequentemente menor sobrevida dos pacientes e também a um maior risco de metástase em outros sítios (BRAUN et al., 2005; DA COSTA et al., 2011; JANNI et al., 2011). Assim, o diagnóstico tanto das CTC's quanto das CTD's é utilizado para avaliação de prognóstico, estratificação de pacientes com risco de recidivas para terapias diferenciais e como biomarcadores para monitoramento da eficácia de terapias sistêmicas (RIETHDORF; PANTEL, 2010). Em seres humanos, a identificação de CTD's é feita pelas técnicas de imunocitoquímica ou biologia molecular (PCR) (TAYLOR et al., 2013).

Há relatos de que a remoção precoce do tumor de mama pode não prevenir metástases terciárias de células tumorais encontradas na medula óssea, o que indica que essas células podem ir precocemente do sítio primário para a medula óssea durante a fase inicial do desenvolvimento tumoral (KLEIN, 2008). Walker et al. (2016) observaram em seus estudos que 26% das mulheres com tumor de mama apresentavam micrometástase em medula óssea no momento da primeira cirurgia de retirada do tumor, sendo que esse número chegava a 60% no momento da necropsia de pacientes com tumor de mama que foram à óbito. Braun et al. (2005) observaram que 30,6% das 4.703 mulheres com tumor de mama apresentavam micrometástase em medula óssea no momento do diagnóstico do tumor mamário, estando associado principalmente à tumores maiores que 2 cm, com maior grau histológico e com metástase em linfonodos. Além disso, observaram também que 75% das pacientes morreram nos cinco primeiros anos, devido ao tumor de mama e que o tempo de sobrevida das mulheres que apresentavam micrometástase em medula óssea fora significativamente menor do que o tempo de sobrevida das pacientes que não apresentavam. Mansi et al. (2015) observaram que 25% das pacientes com tumor de mama apresentavam micrometástase em medula óssea no momento da cirurgia de remoção do tumor primário.

Barbosa (2013) detectou em seu estudo a presença de células tumorais em medula óssea de mulheres com tumor de mama, antes que outros focos metastáticos surgissem, e também a proliferação de fibras colágenas e elásticas

na mesma, demonstrando um quadro de fibrose medular secundária ao processo neoplásico. Segundo Harvey (2001), uma das causas de mielofibrose é a presença de células neoplásicas na medula óssea, seja por neoplasias primárias ou metastáticas, devido à produção direta ou indireta de fatores de crescimento capazes de estimular fibroblastos.

Oliveira (2009) observou em seu estudo que pacientes com mielopatia infiltrativa por tumores não hematológicos apresentavam, na avaliação hematológica, anemia, alterações em leucócitos e trombocitopenia.

Alguns dos métodos utilizados para avaliação da medula óssea é o mielograma, o qual preserva as características citológicas das células hematopoiéticas (COWELL et al., 2009; RASKIN; MEYER, 2011). Porém, a biópsia medular é mais indicada quando se busca a presença de comprometimento neoplásico (ALVES, 2009).

Quando apenas o mielograma é realizado e uma baixa celularidade é observada, deve-se descartar a possibilidade de um erro de coleta e diferenciar tal hipocelularidade como um processo hipoplásico, aplásico ou de mielofibrose da medula óssea (HARVEY, 2001) sendo a biópsia óssea indicada nesses casos (MORAES; TAKAHIRA, 2010).

Frente ao exposto, devido às semelhanças entre as características clínicas, patológicas, epidemiológicas e de desenvolvimento tumoral entre cães e seres humanos, as cadelas são modelos naturais para avaliação de tumor mamário em mulheres (CASSALI, 2013). Por esse motivo, a análise da medula óssea como possível sitio de micrometástase auxiliaria não só no estadiamento, mas também no prognóstico da doença em cadelas com tumor de mama assim como em mulheres portadoras desta doença.

3. Referências

AGUIRRE-GHISO, J. A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy, **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 834–846, 2007.

ALVES, A. C. Histologia da medula óssea. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 3, p. 183-188, 2009.

BARBOSA, J. A. P. **Avaliação da medulla óssea no estadiamento do câncer de mama**. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

BOSTOCK, D. E. Canine and feline mammary neoplasms. **British Veterinary Journal**, v. 142, n. 6, p. 506-515, 1986.

BRAUN, S.; VOGL, F. D.; NAUME, B.; JANNI, W.; OSBORNE, M. P.; COOMBERS, R. C.; SCHLIMOK, G.; DIEL, I. J.; GERBER, B.; GEBAUER, G.; PIERGA, J. Y.; MARTH, C.; ORUZIO, D.; WIEDSWANG, G.; SOLOMAYER, E. F.; KUNDT, G.; STROBL, B.; FEHM, T.; WONG, G. Y. C.; BLISS, J.; VINCENT-SALOMON, A.; PANTEL, K. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 8, p. 793-802, 2005.

CASSALI, G. D. Comparative mammary oncology: canine model. **BMC Proceedings**, v. 7, n. 2, p. 1-2, 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.; CAMPO, C. B.; ARAUJO, M. R.; CAMPO, 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.; BATSCINSKI, 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.

CHANTRAIN, C. F.; FERON, O.; MARBAIX, E.; DECLERCK, Y. A. Bone marrow microenvironment and tumor progression. **Cancer Microenvironment**, v. 1, p. 23- 35, 2008.

CHATURVEDI, P.; GILKES, D. M.; TAKANO, N.; SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor-dependent signaling between triple-negative breast cancer cells and mesenchymal stem cells promotes macrophage recruitment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 2120–2129, 2014

CHU, P.G.; WEISS, L.M. Keratin expression. in human tissues and neoplasm. **Histopathology**, v. 40, p. 403-439, 2002.

COLODEL, M. M.; RAMOS, R. S.; ROCHA, N. S. Diagnóstico citopatológico de afecções mamárias em cadelas: revisão. **Veterinária em foco**, v. 8, n. 1, p. 11-22, 2010.

COSTA, A.; OLIVEIRA, J. T.; GÄRTNER, F.; KOHN, B.; GRUBER, A. D.; KLOPFLEISCH, R. Potential markers for detection of circulating canine mammary tumor cells in the peripheral blood. **The Veterinary Journal**, v. 190, p. 165-168, 2011.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-7, 2002.

COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H.; DENICOLA, D. B. **Diagnóstico Citológico e Hematologia de cães e gatos**. MedVet: São Paulo, 2009.

DA COSTA, A.; OLIVEIRA, J. T.; GARTNER, F.; KOHN, B.; GRUBER, A. D.; KLOPFLEISCH, R. Potential markers for detection of circulating canine mammary tumor cells in the peripheral blood. **The Veterinary Journal**, v. 190, p. 165-168, 2011.

DALEK, C. R.; FRANCESCHINI, P.H.; ALESSI, A. C.; SANTANA, A. E.; MARTINS, M. I. M. Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, p. 95-100, 1998.

DELTA, B. G.; PINKEL, D. Bone marrow aspiration in children with malignant tumors. **The Journal of Pediatrics**, v. 64, n. 4. p. 542-546, 1964.

DIEL, I.; KAUFMANN, M.; GOERNER, R.; COSTA, S.; KAUL, S.; BASTERT, G. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 10, p. 1534–1539, 1992.

DONNAY, I.; RAUIS, J.; DEVLEESHIUWER, N.; WOUTERS-BALLMAN, P.; LECLERCQ, G.; VERSTEGEN, J. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 9, p. 1188-1194, 1995.

ELLIS, L. D.; JENSEN, W. N.; WESTERMAN, M. P. Needle biopsy of bone marrow. Na experience with 1.445 biopsies. **Archives of Internal Medicine**, v. 114, n. 2, p. 213-221, 1964.

ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A.; FERNÁNDES, A.; MILLAN, M. Y.; RODRIGUES, F.; HERRÁEZ, P.; MARTÍN DE LAS MULAS, J. Coordinate expression. of cytokeratins 7 and 20 in feline and canine carcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 3. p.179-190, 1999.

FERGUSON, H. R. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics of North America**, v. 15, n. 3, p. 501-511, 1985.

FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A.C.; CAVALCANTI, M.F.; SCHMITT, F.C.; CASSALI, G.D. The relationship between tumor size and expression. Of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumors. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 193, p. 1-6, 2009.

FIGHERA, R.A.; SOUZA, T.M.; SILVA, M.C.; BRUM, J.S.; GRAÇA, D.L.; KOMMERS, G.D.; IRIGOYEN, L.F.; BARRO, C.S.L. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da mesorregião do centro ocidental rio-grandense (1965-2004). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 223-230, 2008.

FILHO, J. C. O.; KOMMERS, G. D.; MATSUDA, E. K.; MARQUES, B. M. P. P.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARRO, C. S. L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 177-185, 2010.

GORGES, T. M.; PANTEL, K. Circulatin tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 62, n. 5, p. 931-939, 2013.

GUNDIM, L.; ARAUJO, C. P.; BLANCA, W. T.; GUIMARAES, E. C.; MEDEIROS, A. A. Clinical staging in bitches with mammary tumors: Influence of type and histological grade. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 80, p. 318-322, 2016.

HARVEY, J. W. **Atlas of Veterinary Hematology: Blood and Bone Marrow of Domestic Animals**. Saunders:Philadelphia, 2001.

HENSON, K. L.; ALLEMAN, R. A.; FOX, L. E.; RICHEY, L. J.; CASTLEMAN, W. L. Diagnosis of disseminated adenocarcinoma by bone marrow aspiration in a dog with leukoerythroblastosis and fever of unknown origin. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 27, n. 3, p. 80-84, 1998.

JAILLARDON, L.; BARTHÉLEMY, A.; GOY-THOLLOT, I.; POUZOT-NEVORET, C.; FOURNEL-FLEURY, C. Mammary gland carcinoma in a dog with peripheral blood and bone marrow involvement associated with disseminated intravascular coagulation. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, n. 2, p. 261-265, 2012.

JANNI, W.; VOGL, F. D.; WIEDSWANG, G.; SYNNESTVEDT, M.; FEHM, T.; JÜCKSTOCK, J.; BORGES, E.; RACK, B.; BRAUN, S.; SOMMER, H.; SOLOMAYER, E.; PANTEL, K.; NESLAND, J.; FRIESE, K.; NAUME, B. Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse – a European pooled analysis. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 9, p. 2967-2976, 2011.

JONSSON, U.; RUNDLES, R. W. Tumor metastases in bone marrow. **Blood**, v. 6, p. 16-25, 1951.

KIM, H. W.; LIM, H. Y.; SHIN, J. I.; SEUNG, B. J.; JU, J. H.; SUR, J. H. Breed and age related differences in canine mammary tumors. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 80, p. 146-155, 2016.

KLEIN, C. A. The direct molecular analysis of metastatic precursor cells in breast cancer: a chance for a better understanding of metastasis and for personalised medicine. **European Journal of Cancer**, v. 44, p. 2721–2725, 2008.

KWON, S. C.; YOO, D. Y.; KO, M.; LEE, K. Y.; KWAK, H. H.; PARK, I. C.; HWANG, I. K.; CHOI, J. H.; CHUNG, J. Y. Mammary gland tumors in a male Cocker Spaniel. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 59, n. 20, p. 1-6, 2017.

MANSI, J.; MORDEN, J.; BLISS, J. M.; NEVILLE, M.; COOMBES, R. C. Bone marrow micrometastases in early breast cancer-30-year outcome. **British Journal of Cancer**, v. 114, p. 243-247, 2015.

MISCHKE, R.; HÖINGHAUS, R.; LÜTKEFELS, E.; BUHL, K.; GERHARDT, A.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M. Immunocytological confirmation of bone marrow metástases in a dog with cholangiocarcinoma. **Journal of Small Animal Practice**, v. 44, p. 411-414, 2003.

MOLL, R.; KREPLER, R.; FRANKE, W.W. Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. **Differentiation**, v. 23, n.3, p. 256-269, 1983.

MORAES, L. F.; TAKAHIRA, R. K. Aplasia medular em cães. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 9, n.1, p. 99-108, 2010.

NOGUEIRA, J. C.; CASTRO, A. C. S. Morfologia das glândulas mamárias (*Mammæ*) de cadelas. In: CASSALI, G. D. **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. MedVet: São Paulo, p. 1-13, 2017.

NOVOSAD, C. A. Principles of treatment for mammary gland tumors. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 107-109, 2003.

NUNES, F. C.; CAMPOS, C. B.; BERTAGNOLLI, A. C. Aspectos epidemiológicos das neoplasias mamárias caninas. In: CASSALI, G. D. **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. MedVet: São Paulo, p. 27-31, 2017.

OLIVEIRA, C. T. **Mielopatia Infiltrativa por Tumores não-Hematológicos**. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento) – Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, 2009.

PANTEL, K.; BRAKENHOFF, R. H. Dissecting the metastatic cascade. **Nature**, v. 4, p. 448-456, 2004.

PETROV, E. A.; ILIEVSKA, K.; TROJACANEC, P.; CELESKA, I.; NIKOLOVSKI, G.; GJUROVSKI, I.; DOVENSKI, T. Canine Mammary Tumours – Clinical Survey. **Macedonian Veterinary Review**, v. 37, n. 2, p. 129-134, 2014.

PIANE, L.; SAYAG, D.; LERMUZEAUX, J.; SEMIN, M. O.; LAMOUR-LAYSSOL, C.; AUMANN, M.; TRUMEL, C. What is your diagnosis? Abnormal cells on a

blood smear from a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 43, n. 3, p. 461-462, 2014.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores prognósticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 97, p. 119-127, 2002.

RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Citologia Clínica de Cães e Gatos: atlas colorido e guia de interpretação**. Elsevier: São Paulo, 2011.

REICH, C. A study of the diagnostic value of sternal puncture in clinical hematology. **The American Journal of Medicine**, v. 189, p. 515-20, 1935.

RIBAS, C. R.; DORNBUSCH, P. T.; FARIA, M. R.; WOUK, A. F. P. F.; CIRIO, S. M. Alterações clínicas relevantes em cadelas com neoplasias mamárias estadiadas. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, n. 1, p. 60-68, 2012.

RIETHDORF, S.; PANTEL, K. Advancing personalized cancer therapy by detection and characterization of circulating carcinoma cells. **New York Annals of the Academy of Sciences**, v. 1210, n.1, p. 66-77, 2010.

SINGH, G.; KRAUSE, J.R.; BREITFIELD, V. Bone marrow examination for metastatic tumor: aspirate and biopsy. **Cancer**, v. 40, p. 2317-2321, 1976.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, p. 573-596, 2003.

STEFANOVIC, S.; SCHUET, F.; SOHN, C.; BECKHOVE, P.; DOMSCHKE, C. Bone marrow microenvironment in cancer patients: immunological aspects and clinical implications. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 32, p. 163-178, 2013.

TAYLOR, B. E.; LEIBMAN, N. F.; LUONG, R.; LOAR, A. S.; CRAFT, D. M. Detection of carcinoma micrometastases in bone marrow of dogs and cats using conventional and cell block cytology. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, n.1, p. 85-91, 2013.

TOT, T. Patterns of distribution of cytokeratins 20 and 7 in special types of invasive breast carcinoma: a study of 123 cases. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 3, n.6, p. 350-356, 1999.

TRIPATHI, C.; TEWARI, B. N.; KANCHAN, R. K.; BAGHEL, K. S.; NAUTIYAL, N.; SHRIVASTAVA, R.; KAUR, H.; BHATT, M. L. B.; BHADARIA, S. Macrophages are recruited to hypoxic tumor areas and acquire a Pro-Angiogenic M2-Polarized phenotype via hypoxic cancer cell derived cytokines Oncostatin M and Eotaxin. **Oncotarget**, v. 5, n. 14, p. 5350-5368, 2014.

ZHANG, X. H. F.; GIULIANO, M.; TRIVEDI, M. V.; SCHIFF, R.; OSBORNE, C. K. Metastasis dormancy in estrogen receptor-positive breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 19, p. 6389-6397, 2013.

WALKER, N. D.; PATEL, J.; MUNOZ, J. L.; HU, M.; GUIRO, K.; SINHA, G.; RAMESHWAR, P. The bone marrow niche in support of breast cancer dormancy. **Cancer Letters**, v. 380, p. 263-271, 2016.

WEISHAAR, K. M.; EDMONDSON, E. F.; THAMM, D. H.; OLVER, C. S. Malignant mesenchymoma with widespread metastasis including bone marrow involvement in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 43, n. 3, p. 447-452, 2014.

WINKLER, I. G.; BARBIER, V.; WADLEY, R.; ZANNETTINO, A. C.; WILLIAMS, S.; LÉVESQUE, J. P. Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow in vivo: serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches. **Blood**, v. 116, p. 375-385, 2010.

CAPÍTULO 2 – PESQUISA DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS EM MEDULA ÓSSEA DE CADELAS COM TUMOR DE MAMA

Talita B. Corsini^{1*}, Paulo H. L. Bertolo¹, Júlio E. H. Monteiro¹, Gabriela P. Lima¹, Letícia Bonato¹, Cristhian V. Estrada², Fabiana D. L. Rocha², Tiago Prada², Bruna F. Firmo², Maricy A. Ferreira³, Andriago B. De Nardi², Rosemeri de O. Vasconcelos¹

¹Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP). Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

² Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP). Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animais, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP). Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

*Email: talitabeani@hotmail.com / (16) 99754-7089

RESUMO

As glândulas mamárias são o segundo sítio mais comum de desenvolvimento tumoral em cadelas. Uma das formas de estadiamento é avaliar a presença ou ausência de metástase à distância, inclusive na medula óssea. Este achado, na Medicina, associa-se a baixa sobrevida de mulheres com tumores mamários, porém na Medicina Veterinária esse estadiamento clínico é mais utilizado para pacientes com linfomas e mastocitomas. Estudos que utilizem a biópsia de medula óssea como método de estadiamento em tumores mamários são escassos, desta forma o presente estudo teve como objetivo avaliar lesões mamárias e a medula óssea de 23 cadelas, buscando-se células tumorais disseminadas ou focos metastáticos. O carcinoma em tumor misto grau I fora o mais observado (22,4%), não havendo diferença estatística com relação ao tamanho tumoral e a presença de metástase em linfonodos. Na medula óssea de uma cadela com carcinossarcoma (4,35%) houve marcação citoplasmática de uma provável célula tumoral disseminada, de origem epitelial, com o anticorpo citoqueratina-19 pela imunohistoquímica. Nenhuma das cadelas que apresentaram redução da celularidade ou fibrose medular, confirmadas pela técnica do Tricrômio de Masson, tiveram marcação celular na imunohistoquímica. Conclui-se então que a avaliação da medula óssea pode ser utilizada como um método de estadiamento do tumor de mama em cadelas, pois células tumorais disseminadas apresentam potencial de se tornarem lesões secundárias, bem como, se disseminarem para focos distantes, causando metástases terciárias num período de tempo indeterminado.

Palavras-chave: biópsia medular, cão, citoqueratina, micrometástase, neoplasia mamária

INTRODUÇÃO

As glândulas mamárias são o segundo sítio mais comum de desenvolvimento tumoral em cães (PETROV et al., 2014). As metástases dos tumores mamários ocorrem mais comumente pelo sistema linfático, mas também podem ocorrer pela corrente sanguínea (NUNES et al., 2017), sendo a metástase pulmonar uma das principais causas de morte desses animais (PETROV et al., 2014). Alguns carcinomas de glândula mamária podem ser detectados através da imunohistoquímica utilizando os anticorpos citoqueratinas 5/6, 7, 8, 18,19 (MOLL et al., 1983).

Desde 1935 há relatos na medicina de infiltração de tumores sólidos na medula óssea (REICH, 1935; JONSON e RUNDLES, 1951; ELLIS et al., 1964; SINGH et al., 1976). Na Medicina Veterinária, estudos mais recentes vêm sendo desenvolvidos e comprovam que cães também podem apresentar micrometástases de tumores epiteliais e mesenquimais em medula óssea (HENSON et al., 1998; MISCHKE et al., 2003; WEISHAAR et al., 2014).

Células do tumor de mama têm a medula óssea como um dos principais sítios metastáticos e essa habilidade confere a elas proteção, especialmente àquelas quiescentes, pois conseguem evadir de agentes tóxicos anti-cancerígenos, já que inúmeros quimioterápicos agem apenas sobre as células cancerígenas que se proliferam rapidamente (DIEL et al., 1992; AGUIRRE-GHISO, 2007). Há relatos de que a remoção precoce do tumor de mama pode não prevenir metástases terciárias, pela migração dessas células para a medula óssea durante a fase inicial do desenvolvimento tumoral (KLEIN, 2008).

Braun et al. (2005) observaram que a presença de micrometástase em medula óssea estava associada principalmente à tumores maiores que 2 cm, com maior grau histológico e com metástase em linfonodos. Barbosa (2013) detectou, além de focos de micrometástase, a proliferação de fibras colágenas e elásticas na medula óssea de pacientes com tumor de mama, demonstrando um quadro de fibrose medular secundária ao processo neoplásico. Segundo Harvey (2001), uma das causas de mielofibrose é a presença de células neoplásicas na medula óssea, seja por neoplasias primárias ou metastáticas, devido à produção direta ou indireta de fatores de crescimento capazes de estimular fibroblastos. Algumas das alterações hematológicas que podem ocorrer em pacientes com mielopatia infiltrativa por tumores não hematológicos são anemia, leucopenia ou leucocitose e trombocitopenia (OLIVEIRA, 2009).

Alguns dos métodos utilizados para avaliação da medula óssea é o mielograma, o qual preserva as características citológicas das células hematopoiéticas (COWELL et al., 2009; RASKIN & MEYER, 2011), porém a biópsia medular é mais indicada quando se busca a presença de comprometimento neoplásico

(ALVES, 2009). Ao se observar uma baixa celularidade no mielograma deve-se descartar a possibilidade de um erro de coleta e diferenciá-la como sendo um processo hipoplásico, aplásico ou de mielofibrose (HARVEY, 2001), sendo a biópsia indicada nesses casos (MORAES & TAKAHIRA, 2010). Devido ao fato de cães infectados por *Ehrlichia canis* poderem desenvolver uma doença crônica que geralmente causa certo grau de hipoplasia medular, que em casos severos pode progredir para aplasia (HARVEY, 2001), o diagnóstico parasitológico, feito pela avaliação direta do esfregaço do mielograma, bem como, por técnicas de biologia molecular deve ser considerado nesses animais.

Frente ao exposto, entende-se que a avaliação da medula óssea em cadelas com tumor de mama pode ser utilizada como uma técnica de estadiamento da doença, uma vez que cadelas são modelos naturais para avaliação dos tumores mamários em mulheres (CASSALI et al., 2013). Por esse motivo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a medula óssea de cadelas com tumor de mama por meio de biópsia e da imunohistoquímica, buscando-se a presença de células epiteliais marcadas com o anticorpo pancitoqueratina 19, aventando-se a hipótese de que essa análise pode ser um fator prognóstico significativo não apenas em mulheres, mas também em cadelas.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS UTILIZADOS

Vinte e três cadelas, sem predileção por raça ou idade, oriundas do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal, SP) foram avaliadas no estudo. Como critério de inclusão fez-se a análise da medula óssea, assim como do tecido mamário das cadelas com tumor de mama, excluindo-se do estudo as que passaram por tratamento quimioterápico prévio.

COLHEITA DO MATERIAL

O estudo foi realizado com biópsias de medula óssea, peças cirúrgicas de mama e linfonodos. Para tanto, os animais selecionados foram submetidos a exames pré-anestésicos (hemograma e avaliação da função renal e hepática, pela dosagem da enzima Alaninoaminotransferase - ALT e da Creatinina séricas), bem como, o exame radiográfico de tórax em três projeções e a ultrassonográfico abdominal, com o intuito de identificar focos de metástase.

As cadelas foram anestesiadas e submetidas à tricotomia, tanto em região epifisária proximal do úmero direito quanto em abdômen ventral. Ato contínuo realizou-se a antissepsia, com clorexidine e álcool nessas áreas, seguida de biópsia de úmero com agulhas tipo Jamshid™ (FERNANDES, 1988; MÜLLER et al., 2009), de 8G, 11G ou 13G, dependendo do tamanho do animal. Nesta etapa fez-se a coleta de um fragmento da medula óssea para biópsia e o aspirado medular para realização do mielograma. Na sequência, foi realizada a mastectomia unilateral total, com retirada dos linfonodos inguinal e axilar.

Nas cadelas com tumor mamário, os fragmentos do tumor, da medula óssea, e dos linfonodos foram colocados em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos (pH 7,4) e encaminhados ao Serviço de Patologia Veterinária da mesma instituição, para a análise histopatológica.

PCR

Com o objetivo de eliminar possíveis alterações em medula óssea provenientes de infecção por *Ehrlichia canis*, uma vez que os animais avaliados são de uma região endêmica para esta doença, as amostras de medula óssea que apresentaram alterações na celularidade foram submetidas a um ensaio de PCR convencional objetivando a amplificação do DNA do agente *Ehrlichia canis*. As análises foram realizadas pelo laboratório Imunodot®, localizado na cidade de Jaboticabal/SP.

MIELOGRAMA

O aspirado medular das cadelas com tumor mamário foi expelido em uma placa de Petri para a visualização das espículas ósseas, que foram transferidas, por meio de tubo capilar, para as lâminas de vidro onde foram feitos os esfregaços. Em seguida, os mesmos foram corados com corante tipo Romanowsky (Panótico Rápido LB®) e analisados em microscópio óptico modelo Nikon E200, em objetiva de grande aumento (40 e 100x).

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Nesta análise foram avaliados em microscopia de luz, os fragmentos de medula óssea, linfonodos e as amostras das cadeias mamárias com tumores. As neoplasias mamárias foram classificadas de acordo com a Organização Mundial de Saúde (MISDORP et al., 1999) e as diretrizes do segundo consenso para diagnóstico, prognóstico e tratamento dos tumores mamários caninos (CASSALI et al., 2014).

As amostras de mama, linfonodo e medula óssea foram fixadas em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos (pH 7,4), durante 48 horas. Após, realizou-se a clivagem do material, processamento histológico de rotina até a inclusão em parafina. Os cortes foram feitos na espessura de 5µm e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina (TOLOSA et al., 2003). Não foi necessário realizar o processo de descalcificação do fragmento da medula óssea.

A análise das biopsias de medula óssea teve como principais objetivos avaliar a presença de células tumorais nas preparações coradas com Hematoxilina e Eosina e também se havia a presença de mielofibrose, utilizando-se para isso a técnica do Tricrômio de Masson. A porcentagem de tecido fibroso na medula óssea foi avaliada pelo sistema de análise de imagens (Image Pro-plus 4.5). Para isso fotografou-se todo o fragmento de medula óssea em campo de grande aumento (40x) em microscópio óptico Nikon E200.

ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Nesta técnica avaliou-se a marcação de células neoplásicas epiteliais na medula óssea, com a utilização do anticorpo citoqueratina-19 (clone AE1/AE3, DakoCytomation, Cód. M3515). De forma geral, as lâminas foram desparafinizadas em estufa a 60°C por uma hora e posteriormente banhadas por 20 minutos em xilol. Em seguida, as lâminas foram hidratadas em soluções com concentrações decrescentes de álcool, até a lavagem em água destilada. Para a imunomarcação do referido anticorpo foi realizada a recuperação antigênica no calor (em câmara de pressão Pascal, Dako), com solução tampão Citrato de Sódio (pH 6,0). No bloqueio da peroxidase endógena utilizou-se solução de peróxido de hidrogênio e metanol a 10% (90 mL de álcool metílico e 10 mL de peróxido de hidrogênio 30 volumes) por 30 minutos, à temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida realizou-se o bloqueio das proteínas inespecíficas com produto comercial (Protein Block, Dako, Cód. X0909), por 30 minutos, em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados com o anticorpo primário, em diluição de 1:200 por 18 horas a 4 °C em câmara úmida escura.

Como substrato da reação utilizou-se o Complexo de Polímeros ligados a peroxidase (Kit Advance, Dako cód. K4068). Entre cada um dos passos descritos foram feitos banhos em água destilada e em solução tampão Tris HCl, pH 7,4, por 5 minutos cada. Para visualização da reação utilizou-se o cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina - Dako, cód. K3468-1), por 3 minutos por lâmina. Em seguida, fez-se a contra-coloração com Hematoxilina de Harris e a montagem das lâminas com Entellan (Merk).

Como controle positivo da técnica de imunohistoquímica foi utilizado intestino de cão. Amostras de medula óssea de animais livres de neoplasias mamárias foram utilizados como controle negativo. A determinação do número de células imunomarcadas foi realizada observando-se todo o fragmento da medula óssea com objetiva de 40x (área de 0,19625 mm²), em microscópio óptico Nikon E200.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a presença ou a ausência de células tumorais na medula óssea fez-se a divisão do número total de casos positivos pelo número total de pacientes. Para correlacionar a frequência de metástases, aplicou-se o Teste de Proporções e Teste Qui-Quadrado. As análises foram feitas no programa GraphPad Prism (versão 5.0,2007), considerando-se as diferenças significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

No presente estudo, a idade média das cadelas avaliadas foi de $10,6 \pm 2,8$ anos. Avaliou-se cadelas de diferentes raças como SRD (65,2%), Poodle (13,1%); Daschund (13,1%); Lhasa Apso (4,3%) e Beagle (4,3%) e o peso corporal médio delas foi de $9,98 \pm 4,68$ Kg. A mama inguinal foi a mais acometida (25,5%), seguida da abdominal caudal (21,8%) e abdominal cranial (21,8%), torácica caudal (16,4%) e por fim torácica cranial (14,5%). A maioria das cadelas (95,7%) apresentavam lesões em apenas uma cadeia mamária.

Quanto a classificação histológica dos tumores, 77,6% eram de comportamento maligno, sendo o carcinoma em tumor misto grau I o mais observado (22,4%). Com relação ao tamanho, 72,4% dos tumores eram menores de 3 cm, 15,5% tinham entre 3 e 5 cm e 12,1% eram maiores que 5cm.

A relação entre o tamanho tumoral e a presença ou não de metástase em linfonodos (Tabela 1) não apresentou diferença significativa ($p = 0,8118$), ou seja, não houve relação de dependência entre elas.

Das 22 cadelas que apresentavam tumores mamários, já que a mastite apresentada por uma delas é uma lesão mamária não neoplásica, 8 (36,4%) apresentavam mais de dois histotipos tumorais, 7 (31,8%) apresentavam dois tipos e 7 (31,8%) apresentavam apenas um tipo histológico de tumor de mama, sendo que a maioria das cadelas apresentava apenas uma mama acometida.

Os exames bioquímicos das cadelas do presente estudo não apresentaram alterações dignas de nota. Já no hemograma pode-se observar algumas alterações como: uma cadela apresentou anemia; duas apresentaram anemia e leucocitose; cinco tiveram leucopenia e anemia e uma apresentou anemia,

leucopenia e trombocitopenia. A maioria dessas cadelas com alterações no hemograma apresentaram também alterações de celularidade em medula óssea.

No mielograma não foram observadas células com morfologia atípica sugestiva de células neoplásicas. Na avaliação histopatológica corada pela Hematoxilina e Eosina, 11 cadelas apresentaram quantidade e morfologia celular normais. Já nas outras 12 cadelas pode-se observar morfologia celular normal, porém hiper celularidade em uma cadela e diminuição da quantidade celular na medula de 11 cadelas, sendo essa diminuição discreta em quatro cadelas, moderada em seis cadelas e acentuada em uma cadela. No exame de PCR dessas 11 cadelas, apenas três foram positivas (27,3%) para pesquisa do parasita *Ehrlichia canis*. Esses animais corresponderam a cadelas com moderada e acentuada diminuição da celularidade e predomínio de tecido adiposo no tecido medular (Fig 01). No hemograma dessas três cadelas observou-se anemia e leucopenia. Nos cortes histológicos de medula óssea corados com Tricrômio de Masson observou-se a presença de fibrose em quatro cadelas (17,39%), sendo três discretas e uma moderada (Fig 1).

Na avaliação imunohistoquímica apenas uma cadela (4,35%) apresentou célula epitelial com marcação citoplasmática do anticorpo citoqueratina-19 (Fig 1), podendo esta ser considerada uma célula tumoral disseminada presente na medula óssea. Esta medula se apresentou discretamente hipocelular na análise da biópsia (Fig 1), porém no hemograma pode-se observar a presença de anemia, leucopenia e trombocitopenia moderadas.

DISCUSSÃO

No presente estudo, 56,5% das cadelas avaliadas tinham 10 anos ou mais, o que difere observado por Filho et al. (2010) e Kim et al. (2016), que em seus estudos avaliaram uma porcentagem maior de cadelas com menos de 10 anos. Porém, tais dados são semelhantes aos observados por Petrov et al. (2014), que reportaram uma predominância de tumores de mama em cadelas com idade entre 12 a 13 anos. Ademais, não houve predileção racial, uma vez que a maioria das cadelas (65,2%) não possuíam raça definida, concordando com Gundim et al. (2016), os quais afirmam não haver predisposição racial para o desenvolvimento dos tumores mamários.

Em relação às mamas mais acometidas, observou-se que a mama inguinal foi a mais afetada (25,5%), sendo a torácica cranial a que menos apresentou lesões neoplásicas (14,5%), dados esses que coincidem com outros estudos (DALEK et al., 1998; HASHIMOTO et al., 2002; FILHO et al., 2010; CASSALI et al.,

2014). Provavelmente, estes dados estão associados ao fato de haver maior quantidade de receptores hormonais de estrogênio e progesterona nas mamas abdominal caudal e inguinal quando comparados às outras (DONNAY et al., 1995). Entretanto, estudos mais recentes associam a maior ocorrência de tumores em tais mamas, provavelmente devido a maior quantidade de parênquima mamário nessa região (FILHO et al., 2010).

A maioria dos tumores avaliados neste estudo eram malignos (77,6%), o que confirma as observações dos estudos de Queiroga & Lopes (2002) e Filho et al. (2010), nos quais as neoplasias malignas foram mais prevalentes que as benignas. Ao contrário do observado por Oliveira et al. (2003), a maioria das cadelas apresentavam tumores em apenas uma cadeia mamária no momento do diagnóstico. A maior parte das cadelas (65,3%) apresentavam mais de um histotipo tumoral, diferente do que foi observado por Filho et al. (2010). Além disso, as cadelas acometidas neste estudo estavam clinicamente saudáveis no momento em que as neoplasias foram observadas, assim como reportado por Cassali et al. (2014).

Filho et al. (2010), em estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães, observaram que o carcinoma simples era o tipo histológico mais observado, assim como Dalek et al. (1998) e Petrov et al. (2014). Já neste estudo, o tipo histológico predominante foi o carcinoma em tumor misto grau I, o que contradiz os estudos citados anteriormente, porém corrobora com o estudo de Cassali (2013), o qual afirma que os tumores mistos são os tumores mamários mais frequentemente encontrados em cadelas. Uma das possíveis causas para alta prevalência dos tumores mamários malignos é, de acordo com Oliveira et al. (2003), o tempo prolongado entre o aparecimento do tumor e a avaliação clínica, uma vez que há evidências de que o tempo prolongado possibilita a progressão de tumores benignos para malignos (SORENMO, 2009).

A maioria dos tumores analisados neste estudo eram malignos, porém de baixo grau. Além disso, não houve diferença significativa na análise estatística quando se comparou o tamanho do tumor com a presença de metástase em linfonodos. Tais resultados provavelmente devem-se ao fato de os proprietários levarem os animais precocemente ao veterinário para remoção cirúrgica dos tumores, considerando-se que a maioria deles (72,4%) apresentava menos de 3 cm. Isso pode ser observado também nos resultados encontrados por Chang et al. (2005), que relataram que 86% dos cães que apresentavam metástase em linfonodos apresentavam tumores grandes, e Filho et al. (2010), que concluíram que tumores com mais de 5 cm apresentavam maior grau de malignidade.

Na avaliação da medula óssea, a hipocelularidade acentuada, a hipocelularidade moderada associada a uma intensa hemossiderose e a presença discreta de fibrose observada em três cadelas, deve-se provavelmente ao fato de o parasita *Ehrlichia canis* estar presente na medula óssea, o que explica a anemia e a leucopenia encontradas no hemograma. A explicação para este achado é a de que cães infectados por *Ehrlichia canis*, principalmente em regiões endêmicas, como a do presente estudo, podem desenvolver doença crônica que geralmente causa certo grau de hipoplasia medular, podendo, em casos severos, progredir para aplasia (HARVEY, 2001). Nestes animais, não foram encontradas células tumorais na medula óssea, e por esse motivo essas cadelas foram mantidas no estudo. As outras cadelas que apresentaram hipocelularidade, inclusive duas com presença de fibrose medular, confirmada pela coloração de Tricrômio de Masson, não apresentaram positividade nem no exame de PCR convencional, nem na avaliação imunohistoquímica. Porém, isso não exclui a possibilidade destes animais apresentarem o parasita ou micrometástase neste órgão.

Diferentemente do encontrado por Barbosa (2013), a cadela cuja presença de célula epitelial em medula óssea foi confirmada pela marcação com o anticorpo citoqueratina-19 na imunohistoquímica, não apresentou fibrose medular. Porém, este resultado corrobora com os estudos de Braun et al. (2005), os quais demonstraram haver associação entre a presença de micrometástase em medula óssea e tumores maiores que 2 cm com maior grau histológico, uma vez que no presente estudo essa cadela apresentava carcinossarcoma maior que 5 cm em mama inguinal. Além disso, o hemograma dessa cadela correspondeu com o observado por Oliveira (2009), isto é, presença de moderadas anemia e leucopenia.

A obtenção de amostras pequenas relacionadas ao tamanho dos animais avaliados; dificuldades nas coletas pelas agulhas utilizadas serem para uso em humanos e, por alguns tutores não autorizarem a realização da biópsia medular, foram alguns dos fatores que limitaram o tamanho da amostra. Esses motivos, associados ao fato de animais de pequeno porte poderem apresentar claudicação e dor após a coleta, fizeram com que as coletas fossem feitas de apenas um local. Ao contrário, Mansi et al. (2016) realizaram a coleta da medula óssea de mulheres em oito sítios de coleta diferentes. No presente estudo, a não observação de células neoplásicas no exame histopatológico da medula óssea, possivelmente deve-se ao fato das células tumorais poderem estar presentes em outros locais que não foram acessados. Caso houvesse instrumental específico para uso em animais de diferentes tamanhos, o risco de sequelas pós-coleta seria menor, o que possibilitaria a obtenção de amostras medula óssea de melhor qualidade e de diferentes sítios de coleta.

Em outros estudos descreve-se a técnica de aspiração da medula óssea seguida da marcação de células tumorais pela técnica de imunocitoquímica (BRAUN et al., 2005; VICENT-SALOMON et al., 2008; JANNI et al., 2011; HARTKOPF et al., 2015; SCHINDLBECK et al., 2016). Barbosa et al. (2013) utilizaram a biópsia de medula óssea associada à imunohistoquímica para marcação de células tumorais e, assim como no presente estudo, apenas uma amostra foi positiva para essa marcação. Dessa maneira, podemos sugerir que a técnica de imunocitoquímica aumentaria a probabilidade de confirmação da presença de CTD's, bem como, de focos de micrometástase medular, quando comparada a técnica de imunohistoquímica. Além disso, a coleta de vários sítios de medula óssea distintos aumentaria as chances de se encontrar micrometástase neste órgão, porém na medicina veterinária esse é, inúmeras vezes, um fator limitante devido à grande variação no porte dos animais.

Segundo Meng et al. (2004) e Lacroix (2006), tanto as CTD's quanto as CTC's são difíceis de serem caracterizadas, pois são encontradas uma a cada 10^6 células de medula óssea e uma ou duas a cada 20 mL de sangue, respectivamente. Essa baixa probabilidade de detecção destas células foi confirmada no presente estudo, pois apenas uma célula positiva para a citoqueratina-19 foi identificada na medula óssea de uma cadela com neoplasia mamária maligna. Essa célula foi considerada uma CTD e não um foco de micrometástase, pois de acordo com Aguirre-Guiso (2007), essas células tumorais que foram separadas fisicamente do tumor primário e se espalharam não são consideradas micrometástase, pois ainda não expandiram-se para formar uma pequena população de células no nicho metastático.

Outro fator que reforça a baixa quantidade de resultados positivos para a presença de micrometástase na medula óssea das cadelas avaliadas neste estudo é o fato de, na Medicina Veterinária, existirem raros estudos que façam essa detecção, o que gera falta de padronização nos métodos diagnósticos e na escolha de um painel de marcadores/anticorpos (JANNI, 2005). Oposto a isso, na Medicina humana, células epiteliais são detectadas em aspirados de medula óssea em quase todos os tipos de Carcinomas, com uma prevalência média de 30 a 35%, devido a uma melhor padronização da técnica (FUNKE & SCHRAUT, 1998).

Neste estudo demonstrou-se que a biópsia de medula óssea de cadelas com tumor de mama pode ser utilizada como um dos métodos de estadiamento do tumor de mama. Entretanto, estudos futuros devem ser realizados, avaliando-se mais sítios de coleta em um mesmo animal e também associando-se as técnicas de imunohistoquímica e imunocitoquímica. Além disso, tanto as CTD's quanto as CTC's possuem características fenotípicas diferentes quando comparadas ao tumor primário (DELTA & PINKE, 1964) e,

que células tronco tumorais detectadas em tumores de mama de grau histológico mais agressivo, com fenótipo CD44⁺/CD24⁻ pela imunohistoquímica (MAGALHÃES et al., 2013). Por este fato, em estudos futuros sugere-se avaliar estes aspectos na medula óssea, buscando-se a detecção de micrometástase e determinar fatores prognósticos para a paciente oncológica.

Por fim, a seleção de pacientes com tumores de mama que são positivos para receptores de estrógeno (ER⁺) poderia aumentar a probabilidade de detecção de micrometástase na medula óssea das cadelas, uma vez que mais de 50% das recorrências desses tumores em mulheres ocorrem após 5 anos do diagnóstico e da remoção cirúrgica do tumor primário. Isso sugere que as células cancerígenas ER⁺ podem ficar dormentes por um período de tempo prolongado independente das terapias adjuvantes utilizadas (ZHANG et al., 2013).

CONCLUSÃO

Frente ao exposto, pode-se concluir que, a avaliação da medula óssea pode ser realizada como um dos métodos de estadiamento do tumor de mama canino, uma vez que as CTD's podem ser encontradas, indicando que esse pode ser um dos sítios metastáticos primários. Isso demonstra que a padronização e aplicação desta técnica, pode ser importante não apenas em mulheres, mas também em cadelas com tumores com potencial metastático.

CUMPRIMENTO AOS PADRÕES ÉTICOS

Todas as diretrizes internacionais, nacionais e / ou institucionais aplicáveis ao cuidado e uso de animais foram seguidas. O presente estudo fora avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista (CEUA-UNESP), Campus de Jaboticabal, sob nº Protocolo nº 008381/17.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

AGRADECIMENTOS

Os autores deste estudo gostariam de agradecer aos Serviços de Oncologia Veterinária (SOV) e de Obstetrícia e Reprodução Animal, por gentilmente cederem às amostras deste estudo. Agradecimentos para Antonio Roveri Neto pela assistência histotécnica no processamento das amostras.

REFERÊNCIAS

- Aguirre-Ghiso JA. (2007) Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy, *Nat Rev Cancer*. 7:834–846
- Alves A.C. (2009) Histologia da medula óssea. *Rev Bras Hematol Hemoter* 31(3): 183-188
- Barbosa J.A.P. (2013) Avaliação da medulla óssea no estadiamento do câncer de mama. Dissertação, Universidade Federal de Pernambuco
- Braun S, Vogl FD, Naume B et al (2005) A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 335(8): 793-802
- Cassali GD (2013) Comparative mammary oncology: canine model. *BMC Proceedings* 7(2):1-2
- Cassali GD, Lavallo GE, Ferreira E et al (2014) Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. *BJVP* 7(2):38-69
- Chang S, Chang C, Chang T, Wong M (2005) Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *J Am Vet Med Assoc* 227(10): 1625-1629
- Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH., Denicola DB (2009) Diagnóstico Citológico e Hematologia de cães e gatos, 3rd edn. MedVet, São Paulo
- Dalek CR, Franceschini PH, Alessi AC, Santana AE, Martins MIM (1998) Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. *Ciência Rural* 28(1): 95-100
- Delta BG, Pinkel D. (1964). Bone marrow aspiration in children with malignant tumors. *The Journal of Pediatrics*, 64(4): 542-546

Diel I, Kaufmann M, Goerner R, Costa S, Kaul S, Bastert G (1992) Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis, *J Clin Oncol* 10: 1534–1539

Donnay I, Rauis J, Devleeshuwer N, Wouters-Ballman P, Leclercq G, Verstegen J (1995) Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *Am J Vet Res* 56(9): 1188-1194

Ellis LD, Jensen WN, Westerman MP (1964) Needle biopsy of bone marrow. Na experience with 1.445 biopsies. *Archives of Internal Medicine* 114 (2): 213-221

Fernandes AH (1988) Biópsia Óssea. *Acta Med Port* 3: 239-241

Filho JCO, Kommers GD, Matsuda EK, Marques BMPP, Figuera RA, Irigoyen LF, Barro CSL (2010) Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *PesqVet Bras* 30(2): 177-185

Funke I, Schraut W (1998). Meta-analyses of studies on boné marrow micrometastases: na independente prognostic impact remains to be substantiated, *J Clin Onc*, 16(2): 557-566

Gundim L, Araujo CP, Blanca WT, Guimaraes EC, Medeiros AA (2016) Clinical staging in bitches with mammary tumors: Influence of type anda histological grade. *Can J Vet Res* 80: 318-322

Hartkopf AD, Taran FA, Walter CB, Hahn M, Fehm T, Wallwiener M, Brucker SY (2015) Detection and prevalence of disseminated tumor cells from the boné marrow of early stage male breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 152: 51-55

Harvey JW (2001) *Atlas of Veterinary Hematology: Blood and Bone Marrow of Domestic Animals*. Saunders, Philadelphia

- Hashimoto S, Yamamura H, Sato T, Kanayama K, Sakai T (2002) Prevalence of mammary gland tumor of small breed dog in the Tokyo metropolitan area. *J. Vet. Epidemiol* 6(2): 85-91
- Henson KL, Alleman RA, Fox LE, Richey LJ, Castleman WL (1998) Diagnosis of Disseminated Adenocarcinoma by Bone Marrow Aspiration in a Dog with Leukoerythroblastosis and Fever of Unknown Origin. *Vet Clin Pathol* 27(3): 80-84
- Janni W, Rack B, Schindlbeck C et al (2005) The persistence of isolated tumor cells in the bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer* 103(5): 884-891
- Janni W, Vogl FD, Wiedswang G et al (2011) Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse – a European pooled analysis. *Clin Cancer Res* 17(9): 2967-2976
- Jonsson U, Rundles RW (1951) Tumor metastases in bone marrow. *Blood* 6: 16- 25.
- Kim HW, Lim HY, Shin JI, Seung BJ, Ju JH, Sur JH (2016) Breed and age related differences in canine mammary tumors. *Can J Vet Res* 80: 146-155
- Klein CA (2008) The direct molecular analysis of metastatic precursor cells in breast cancer: a chance for a better understanding of metastasis and for personalised medicine. *Eur. J. Cancer* 44: 2721–2725
- Lacroix M (2006) Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 13(4): 1033-1067
- Magalhães GD, Terra EM, Vasconcelos RO, Bandarra MB, Moreira PRR, Rosolem MC, Alessi AC. (2013) Immunodetection of cells with a CD44+/CD24- phenotype in canine mammary neoplasms. *BMC Veterinary Research* 9: 2-6.
- Mansi J, Morden J, Bliss JM, Neville M, Coombes RC (2016) Bone marrow micrometastases in early breast cancer-30-year outcome. *Br J Cancer* 114: 243-247

Meng S, Tripathy D, Frenkel E et al. (2004) Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. Clin Cancer Research, 10: 8152-8162

Mischke R, Höinghaus R, Lütkefels E, Buhl K, Gerhardt A, Hewicker-Trautwein M (2003) Immunocytological confirmation of bone marrow metastases in a dog with cholangiocarcinoma.. J Small Anim Pract 44: 411-414

Moll R, Krepler R, Franke WW (1983) Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. Differentiation 23(3):256-269.

Moraes LF, Takahira RK (2010) Aplasia medular em cães. Revista de Ciências Agroveterinárias 9(1): 99-108

Müller DCM, Pipp NL, Basso PC, Olsson DC, Junior EBS, Guerra ACO (2009) Técnicas e sítios de coleta de medulla óssea em cães e gatos. Ciência Rural 39(7): 2243-2251

Nunes FC, Campos CB, Bertagnolli AC (2017) Aspectos epidemiológicos das neoplasias mamárias caninas. In: Cassali, GD (ed) Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento. MedVet, São Paulo, pp 27-31

Oliveira LO, Oliveira RT, Loretti AP, Rodrigues R, Driemeier D (2003) Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. Acta Sci Vet 31(2): 105-110

Oliveira CT (2009) MielopatiaInfiltrativa por Tumores não-Hematológicos. Dissertação, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Petrov EA, Ilievska K, Trojancanec P, Celeska I, Nikolovski G, Gjurovski I, Dovenski T (2014) Canine Mammary Tumours – Clinical Survey. Mac Vet Rev 37(2): 129-134

Queiroga F, Lopes C (2002) Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores prognósticos. *Ver Port Cienc Vet* 97: 119-127

Raskin RE, Meyer DJ (2011) *Citologia Clínica de Cães e Gatos: atlas colorido e guia de interpretação*, 2nd edn, Elsevier, São Paulo

Reich C (1935) A study of the diagnostic value of sternal puncture in clinical hematology. *Am J Med* 189: 515-20

Schindlbeck C, Andergassen U, Jueckstock J, Rack B, Janni W, Jeschke U (2016) Disseminated and circulating tumor cells in bone marrow and blood of breast cancer patients: properties, enrichment, and potential targets. *J Cancer Res Clin Oncol* 142: 1883-1895

Singh G, Krause JR, Breitfield V (1976) Bone marrow examination for metastatic tumor: aspirate and biopsy. *Cancer* 40: 2317-2321

Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA et al (2009) Canine mammary gland tumors; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol* 7(3): 162-172

Stefanovic S, Schuet F, Sohn C, Beckhove P, Domschke C (2013) Bone marrow microenvironment in cancer patients: immunological aspects and clinical implications. *Cancer Metastasis Ver* 32: 163-178

Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Freitas-Neto AG. (2003). *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*, Manole, São Paulo, 331 pp.

Tot T (1999). Patterns of distribution of cytokeratins 20 and 7 in special types of invasive breast carcinoma: a study of 123 cases. *Ann Diagn Pathol* 3(6): 350-356.

Vincente-Salomon A, Bidard FC, Pierga JY (2008) Bone marrow micrometastasis in breast cancer: review of detection methods, prognostic impact and biological issues. *J Clin Pathol* 61: 570-576

Zhang XHF, Giuliano M, Trivedi MV, Schiff R, Osborne CK (2013) Metastasis dormancy in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clinical Cancer Research* 19: 6389-6397

Weishaar KM, Edmondson EF, Thamm DH, Olver CS (2014) Malignant mesenchymoma with widespread metastasis including bone marrow involvement in a dog. *Vet Clin Pathol* 43(3): 447–452

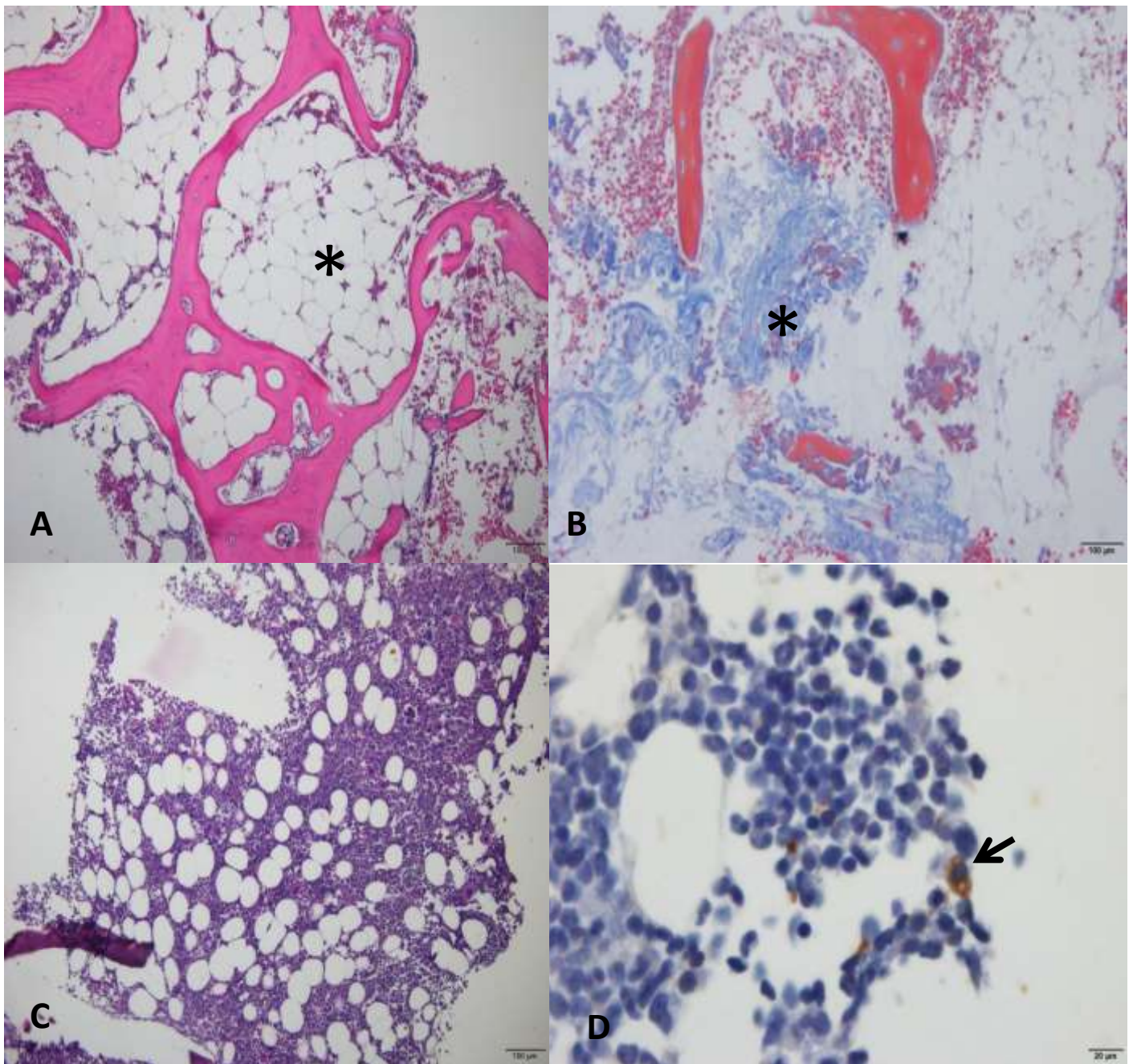


Fig 1 Fotomicrografias da medula óssea de cadela com tumor de mama. A) Notar acentuada hipocelularidade e predomínio de tecido adiposo, em cadela positiva para *Ehrlichia canis* (Barra = 100 µm; Hematoxilina e Eosina). B) Observar a proliferação de tecido fibroso na medula (Barra = 100 µm; Tricrômio de Masson). C) Notar a medula normocelular na análise da biopsia (Barra = 100 µm, Hematoxilina e Eosina). D) Mesmo animal de C que mostrou uma célula epitelial positiva para citopoqueratina-19 (seta; Barra = 20 µm, Complexo de polímeros ligados a peroxidase).

Tabela 1: relação entre o tamanho tumoral e a presença/ausência de metástase em linfonodos

Metástase em linfonodos	Tamanho do tumor (cm)			Total
	< 3	3 – 5	> 5	
Sim	1	2	1	4
Não	8	7	4	19
Total	9	9	5	23

Teste Qui Quadrado, $p > 0,05$

Tabela 2: dados dos animais avaliados e resultados dos seus respectivos exames realizados

Animal	Idade (anos)	Raça	Histotipo tumoral (mama)	Metástase Linfonodo	celularidade MO (HE)	fibrose MO (TM)	IH (MO)	PCR (MO) <i>Ehrlichia canis</i>	Hemograma
1*	8	SRD	mastite crônica (Acr, Aca, Tcr, Tca, I)	ausente	normocelular	ausente	negativo	não reaizado	normal
2	11	Poodle	carcinoma lobular <i>in situ</i> não invasivo (Aca) carcinoma em tumor misto grau II (I)	ausente	intensa hipocelularidade	ausente	negativo	positivo	anemia leucopenia
3	8	SRD	tumor misto benigno (I)	ausente	normocelular	ausente	negativo	não realizado	normal
4	10	SRD	carcinoma em tumor misto grau I (Acr) adenomioepitelioma maligno (Aca) tumor misto benigno (I)	presente (inguinal)	moderada hipocelularidade com proliferação de tecido fibrocolagenoso	moderada	negativo	negativo	anemia leucopenia
5	13	SRD	tumor misto benigno (Acr) carcinossarcoma (Aca) adenoma tubular (I)	ausente	moderada hipocelularidade	ausente	negativo	negativo	normal
6	16	Poodle	carcinoma em tumor misto grau I (Tca, Acr, Aca, I esquerdas) carcinossarcoma (Aca direita)	ausente	normocelular	ausente	negativo	não realizado	normal
7	7	SRD	carcinoma em tumor misto grau I (Tcr) carcinoma lobular <i>in situ</i> invasivo (Acr) carcinoma em tumor misto grau II (I)	ausente	moderada hipocelularidade	discreta	negativo	positivo	anemia leucopenia
8	10	Daschund	carcinoma ductal <i>in situ</i> não invasivo (Tcr) carcinoma tubular grau I (Tca) carcinoma em tumor misto grau I (Acr) tumor misto benigno (I)	ausente	normocelular	ausente	negativo	não realizado	anemia leucopenia
9	9	Daschund	carcinoma lobular <i>in situ</i> não invasivo (Tca) carcinossarcoma (I)	ausente	discreta hipocelularidade	ausente	positivo	negativo	anemia leucopenia trombocitopenia
10	8	Lhasa Apso	carcinoma tubular grau II (Acr)	ausente	moderada hipocelularidade	ausente	negativo	positivo	anemia leucopenia
11	12	SRD	carcinoma lobular <i>in situ</i> não invasivo (Tca) adenomioepitelioma maligno (Aca, I)	ausente	discreta hipocelularidade	ausente	negativo	negativo	normal
12	14	SRD	adenomiepitelioma maligno (Acr)	ausente	discreta hipocelularidade	ausente	negativo	negativo	normal

1*: controle negativo da imunohistoquímica

Tcr: mama torácica cranial; Tca: mama torácica caudal; Acr: mama abdominal cranial, Aca: mama abdominal caudal; I: mama inguinal

HE: Hematoxilina e Eosina

TM: Tricrômio de Masson

IM: Imunohistpquímica

MO: medula óssea

Tabela 3: dados dos animais avaliados e resultados dos seus respectivos exames realizados

Animal	Idade (anos)	Raça	Histotipo tumoral (mama)	Metástase Linfonodo	celularidade MO (HE)	fibrose MO (TM)	IH (MO)	PCR (MO) <i>Ehrlichia canis</i>	Hemograma
13	10	Poodle	carcinoma lobular <i>in situ</i> não invasivo (Tca) carcinoma de células escamosas mamário (Aca) carcinoma sólido grau III (I)	presente (inguinal)	normocelular	ausente	negativo	não realizado	normal
14	13	SRD	carcinoma ductal <i>in situ</i> não invasivo (Tcr) carcinoma em tumor misto grau II (Tca) carcinoma de células escamosas mamário (Aca)	presente (inguinal)	moderada hipocelularidade	ausente	negativo	negativo	normal
15	10	SRD	carcinoma ductal <i>in situ</i> alto grau e adenomioepitelioma benigno (Acr) tumor misto benigno (Tca)	ausente	normocelular	ausente	negativo	não realizado	normal
16	8	SRD	carcinoma em tumor misto grau I (Tcr)	ausente	normocelular	ausente	negativo	não realizado	normal
17	10	SRD	carcinoma em tumor misto grau I (Aca)	ausente	normocelular	ausente	negativo	não realizado	normal
18	13	Daschund	carcinoma papilar invasivo (Tcr) carcinoma em tumor misto grau I e carcinoma cribiforme (Tca) carcinoma em tumor misto grau I (Acr) carcinoma de células escamosas mamário (Aca)	ausente	normocelular	ausente	negativo	não realizado	anemia leucocitose
19	10	SRD	tumor misto benigno (Acr) osteossarcoma mamário (I)	ausente	normocelular com presença de hemossiderose	ausente	negativo	não realizado	anemia leucocitose
20	9	SRD	carcinoma papilar não invasivo (I)	ausente	normocelular com presença de hemossiderose	ausente	negativo	não realizado	normal
21	8	SRD	carcinoma papilar não invasivo (Tcr) carcinoma em tumor misto grau I (I)	ausente	moderada hipocelularidade	discreta	negativo	negativo	
22	8	SRD	adenomioepitelioma maligno (Tcr e Acr)	presente (inguinal e axilar)	discreta hiper celularidade	ausente	negativo	não realizado	anemia
23	8	Beagle	adenomioepitelioma maligno (Acr) carcinoma micropapilar invasivo (I)	ausente	discreta hipocelularidade	discreta	negativo	negativo	leucopenia

Tcr: mama torácica cranial; Tca: mama torácica caudal; Acr: mama abdominal cranial, Aca: mama abdominal caudal; I: mama inguinal

HE: Hematoxilina e Eosina

TM: Tricrômio de Masson

IM: Imunohistpquímica

MO: medula óssea