

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE - UNICENTRO

**DIFERENÇA DOS NÍVEIS SÉRICOS DO
MARCADOR TUMORAL CEA EM CADELAS
(*Canis lupus familiaris*) COM ALTERAÇÕES
MAMÁRIAS NÃO NEOPLÁSICAS E NEOPLASIAS
MAMÁRIAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ALICE REGINA MACHADO RABBERS

GUARAPUAVA-PR

2019

ALICE REGINA MACHADO RABBERS

**DIFERENÇA DOS NÍVEIS SÉRICOS DO MARCADOR TUMORAL CEA EM
CADELAS (*Canis lupus familiaris*) COM ALTERAÇÕES MAMÁRIAS NÃO
NEOPLÁSICAS E NEOPLASIAS MAMÁRIAS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Liane Ziliotto

Orientadora

GUARAPUAVA-PR

2019

Catalogação na Publicação

Biblioteca Central da Unicentro, Campus Santa Cruz

Rabbers, Alice Regina Machado

R113d

Diferença dos níveis séricos do marcador tumoral cea em cadelas (*Canis lupus familiaris*) com alterações mamárias não neoplásicas e neoplasias mamárias / Alice Regina Machado Rabbers. -- Guarapuava, 2019.

xiii, 46 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, 2019.

Orientadora: Liane Ziliotto

Banca examinadora: Liane Ziliotto, Alexandra Pinheiro Fantinatti, Giuliana G. Kasecker Botelho

Bibliografia

1. Ciências Veterinárias. 2. Estadiamento. 3. Prognóstico. 4. Pseudociese. 5. Lactação. 6. Antígeno carcinoembrionárial. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

CDD 636.089

Alice Regina Machado Rabbers

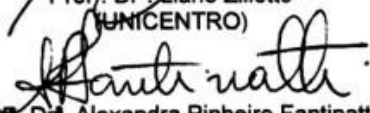
Diferença dos níveis séricos do marcador tumoral CEA em cadelas (Canis lupus familiaris) com alterações mamárias não neoplásicas e neoplásicas mamárias

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 13 de Dezembro de 2019.



Prof. Dr. Liane Ziliotto
(UNICENTRO)



Prof. Dr. Alexandra Pinheiro Fantinatti
(INSTITUTO QUALITAS)



Prof. Dr. Giuliana G. Kasecker Botelho
(UNICENTRO)

GUARAPUAVA-PR
2019

FOLHA DE APROVAÇÃO DO CEUA**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO**

Ofício nº 014/2018 – CEUA/UNICENTRO

Guarapuava, 09 de Julho de 2018.

Senhora Pesquisadora,

1. Comunicamos que seu projeto de pesquisa intitulado: "Avaliação da dosagem do marcador tumoral CA 15-3 em cadelas (*Canis lupus familiaris*) hípidas e com doenças mamárias da rotina da Clínica Escola Veterinária da Unicentro", protocolo número 009/2018, foi analisado e considerado **APROVADO**, pela Comissão de Ética no Uso de Animais de nossa Instituição, na reunião do dia 05 de Julho de 2018.
2. Deverá ser encaminhado à CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.
3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:
 - Os **Relatórios Parciais** deverão ser encaminhados à CEUA assim que tenha **transcorrido um ano da pesquisa**.
 - Os **Relatórios Finais** deverão ser encaminhados à CEUA em até **30 dias após a conclusão da pesquisa**.
 - **Qualquer alteração na pesquisa** que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise da CEUA.

Pesquisador: Profª Liane Zillioto
Atenciosamente,

Presidente do CEUA

A senhora
Profª Liane Zillioto
UNICENTRO-CEDETEG

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO

Ofício nº 012/2019 – CEUA/UNICENTRO

Guarapuava, 16 de Abril de 2019.

Senhora Pesquisadora,

1. Comunicamos que seu pedido de alteração do nome do projeto de pesquisa intitulado: "Avaliação da dosagem do marcador tumoral CA 15-3 em cadelas (*Canis lupus familiaris*) híidas e com doenças mamárias da rotina da Clínica Escola Veterinária da Unicentro", protocolo número 009/2018, aprovado na Reunião do dia 05 de Julho de 2018, como determina o ofício 014/2018, foi analisado e considerado **APROVADO**, pela Comissão de Ética no Uso de Animais de nossa Instituição, na Reunião do dia 05 de Abril de 2019, logo o título do projeto passa a ser: "Avaliação da dosagem do marcador tumoral CEA em cadelas (*Canis lupus familiaris*) híidas e com doenças mamárias".
2. Deverá ser encaminhado à CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.
3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:
 - Os **Relatórios Parciais** deverão ser encaminhados à CEUA assim que tenha **transcorrido um ano da pesquisa**.
 - Os **Relatórios Finais** deverão ser encaminhados à CEUA em até **30 dias após a conclusão da pesquisa**.
 - **Qualquer alteração na pesquisa** que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise da CEUA.

Pesquisador: Profª Liane Zillioto
Atenciosamente,



A Senhora
Profª Liane Zillioto
UNICENTRO-CEDETEG

Dedico este trabalho aos cães, os seres
mais evoluídos que eu já conheci

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus por me permitir chegar até aqui e por me sustentar todos os dias da minha vida.

Agradeço à minha família por todo amor, apoio e carinho, e por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu marido Gustavo, pela paciência e compreensão, por todo companheirismo e por sempre me apoiar e me incentivar em tudo o que eu faço.

À minha orientadora Professora Liane, por toda paciência e atenção que dedicou a mim durante todos estes anos, desde a minha formação, durante a minha residência, e agora no mestrado. Obrigada por ter aceitado me orientar, por sempre estar disposta a me ajudar e por todos os conselhos e ensinamentos.

A todos os meus professores por seu empenho e dedicação em nos ensinar. Em especial, agradeço à Professora Giuliana, minha co-orientadora, por ter aceitado me orientar durante a ausência da Professora Liane; e à Professora Gabriela e à Professora Marília por toda disposição que tiveram em me ajudar durante a confecção deste trabalho.

Aos residentes da CEVET e meus amigos Ana Carla, Marcos, Roberta e Mariani, sem os quais esse trabalho não teria sido realizado, obrigada por toda ajuda durante as coletas das amostras.

Aos meus amigos e colegas de profissão Tatiana, Fábio e Keila, por toda ajuda durante essa pesquisa. Obrigada por me emprestarem a estrutura da VetVitta para ajudar na realização deste trabalho.

Ao médico veterinário Felipe, do laboratório VetPat, por toda ajuda, pelas dicas e pela parceria durante esta pesquisa.

Aos tutores e às cadelas que participaram deste trabalho, espero poder retribuir de alguma maneira.

E por último, minha eterna gratidão ao meu Professor e Mestre Marcos Vinícius Tranquilim, que tive o privilégio de conviver durante a graduação e a residência e que nos deixou cedo demais, mas estará para sempre nas minhas lembranças. Obrigada pelos ensinamentos e conselhos, sua paixão pela nossa profissão era contagiante. Você faz muita falta! Minha gratidão a todos vocês!!!

“...uma vida que é tão breve,
por isso talvez a pressa, a urgência de amar (...)
o amor tem 4 letras, e por certo, 4 patas...”

Braulio Bessa

RESUMO

Alice Regina Machado Rabbers. Diferença dos níveis séricos do marcador tumoral CEA em cadelas (*Canis lupus familiaris*) com alterações mamárias não neoplásicas e neoplasias mamárias.

O antígeno CEA é uma glicoproteína presente no soro utilizado no acompanhamento de mulheres com câncer de mama. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variação do marcador tumoral CEA em cadelas híidas, com neoplasias mamárias e com alterações mamárias não neoplásicas, definindo se estas alterações podem modificar os valores do marcador. Assim, esperou-se constatar se o CEA é específico para identificar apenas lesões neoplásicas da mama, contribuindo para futuramente utilizá-lo no estadiamento, monitoramento e prognóstico dos pacientes. Foi realizada a dosagem sérica do CEA em 30 cadelas, sendo 10 cadelas híidas sem qualquer tipo de alteração mamária (G1 - controle); 10 cadelas com alterações mamárias não neoplásicas, como lactação, pseudociese ou mastite (G2) e 10 cadelas com neoplasia mamária (G3). Nos grupos, pode-se observar uma média de valor das dosagens de 0,12 ($\pm 0,12$) ng/mL no G1 (grupo controle), uma média de 0,68 ($\pm 0,23$) ng/mL no G2 e, no G3 foi observada uma média de 1,29 ($\pm 0,14$) ng/mL. Nas comparações múltiplas das médias, utilizou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$). Através deste estudo, observou-se diferença estatística significativa nos valores do CEA entre os três grupos. As alterações mamárias não neoplásicas podem aumentar os valores do marcador, porém não tanto quanto as neoplasias mamárias. Pode-se concluir que o CEA é um marcador que pode ser utilizado para monitorar neoplasias mamárias em cadelas, porém ele pode se mostrar aumentado em alterações mamárias não neoplásicas, faltando uma melhor definição dos seus valores de referência.

Palavras-chave: estadiamento; prognóstico; pseudociese; lactação; antígeno carcinoembrionário

ABSTRACT

Alice Regina Machado Rabbers. Differences in serum levels of CEA tumor marker in female dogs (*Canis lupus familiaris*) with non-neoplastic mammary changes and mammary neoplasia.

CEA antigen is a serum glycoprotein used to monitoring women with breast cancer. The aims of this study were to evaluate the variations of the CEA tumour marker in healthy bitches, with mammary tumors and with non-neoplastic mammary changes, and to determine if these alterations can alter the values of the marker. Consequently, would be possible to verify if the CEA was specific to identify the specificity for mammary neoplastic alterations, contributing to the future use in the staging, monitoring and prognosis of the patients. CEA serum levels were determined in 30 female dogs: 10 healthy ones without any type of mammary alteration (G1 – control); 10 with non-neoplastic mammary changes, such as lactation, pseudopregnancy or mastitis (G2) and 10 bitches with mammary neoplasia (G3). As a result, an average of 0.12 (± 0.12) ng/mL in G1 (control), an average of 0.68 (± 0.23) ng/mL in G2 and an average of 1.29 (± 0.14) ng/mL in G3 was achieved. In the multiple comparisons of averages, the Tukey's test was used ($p < 0,05$). Through this study, a significant statistical difference was observed in the CEA values between healthy bitches, with mammary alterations and with mammary neoplasia. Base on this, can be concluded that CEA is a marker that can be used for mammary neoplasia in female dogs, however, it may be increased in non-neoplastic mammary changes, lacking a better definition of its reference values.

Keywords: staging; prognosis; pseudopregnancy; lactation; carcinoembryonic antigen

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CEA: antígeno carcinoembrionário

ng/mL: nanogramas por mililitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência dos tipos de alterações mamárias não neoplásicas diagnosticadas no G2 (n=10)	31
Tabela 2 - Frequência de tipos histológicos dos tumores mamários das cadelas do G3 (n=10)	31
Tabela 3 - Média e desvio padrão dos valores das dosagens de CEA no soro de cadelas híidas (G1), com alterações mamárias não neoplásicas (G2) e com neoplasias mamárias (G3)	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Valores séricos do marcador tumoral CEA (média e desvio padrão) nas cadelas dos grupos 1 (cadelas híidas; n=10), grupo 2 (cadelas com alterações mamárias não neoplásicas; n=10) e grupo 3 (cadelas com neoplasias mamárias; n=10)32

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Revisão de literatura	17
2.1. Neoplasias mamárias.....	17
2.2. Alterações mamárias fisiológicas e patológicas não neoplásicas.....	18
2.3. Marcadores tumorais.....	19
2.3.1. Antígeno carcinoembrionário – CEA.....	20
3. Objetivos	23
3.1. Objetivo geral.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. Artigo científico	24
4.1. Resumo.....	24
4.2. Abstract.....	25
4.3. Introdução.....	25
4.4. Material e métodos.....	28
4.5. Resultados.....	30
4.6. Discussão.....	33
4.7. Conclusões.....	36
4.8. Referências.....	36
5. Referências	41
6. Anexos	47

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, têm se verificado o aumento considerável da prevalência de neoplasias mamárias em cadelas, que são consideradas como uma das maiores causas de morte nessa espécie (SORENMO *et al.*, 2013). Estima-se que 48% das cadelas morrem ou são submetidas à eutanásia um ano após a intervenção cirúrgica para tratamento do câncer de mama, devido à recorrência tumoral ou ao aparecimento de metástases (GRAHAM & MYERS, 1999).

Nesse contexto, estudos que investiguem a possibilidade de haver um marcador tumoral que se expresse em resposta à presença do tumor são de grande importância. Tais investigações têm como proposta a utilização desses marcadores para auxiliarem no estadiamento, na detecção precoce de recidivas e metástases e no acompanhamento do animal durante o tratamento quimioterápico, contribuindo para a melhor avaliação da evolução da doença (SENHORELLO, 2017).

O marcador tumoral CEA (antígeno carcinoembrionário) é utilizado para o monitoramento de mulheres com câncer de mama, e vêm sendo estudado para ser aplicado também no monitoramento de cadelas com neoplasias mamárias (CAMPOS *et al.*, 2012; SENHORELLO, 2017). Porém, há poucos dados sobre seus valores na população canina e ainda mais escassas informações sobre seu uso em outras alterações mamárias, como lactação, pseudociese e mastite.

Diante deste cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variação do marcador tumoral CEA em cadelas híidas, com neoplasias mamárias e com alterações mamárias não neoplásicas, definindo se estas alterações podem interferir ou alterar os valores do marcador. E assim, constatar se o CEA é específico para identificar apenas alterações neoplásicas da mama, contribuindo para sua utilização no estadiamento, monitoramento e prognóstico dos pacientes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasias mamárias

A neoplasia é definida como uma perturbação no crescimento celular, que resulta em proliferação celular anormal e descontrolada, podendo ser benigna ou maligna. As neoplasias benignas têm seu crescimento de forma organizada e não desenvolvem metástases. Já as neoplasias malignas, são capazes de invadir tecidos vizinhos e provocar metástases (RODASKI e PIEKARS, 2009).

Com alta incidência nas mulheres, as neoplasias mamárias são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (RIBEIRO, 2012). Elas também são o tipo mais comum de neoplasia em cadelas inteiras, representam de 50% a 70% de todos os tumores que acometem a espécie, e configuram grande importância dentro da clínica de pequenos animais (SORENMO *et al.*, 2013; CASSALI *et al.*, 2014).

Existem semelhanças nas alterações bioquímicas, na epidemiologia e na clínica entre cães e humanos no que diz respeito ao desenvolvimento das neoplasias mamárias. Entre elas estão: a idade, a disseminação de metástase pulmonar e para outros órgãos, a maior incidência de tumores malignos oriundos de células epiteliais e, como fator de risco, o aumento do período de exposição a estrógenos endógenos e exógenos (GARRIDO, 2011). Assim, além da sua importância em medicina veterinária, também servem de modelo para o estudo do câncer de mama na mulher (GARRIDO 2011; FELICIANO *et al.* 2012).

As cadelas com neoplasias mamárias malignas apresentam sobrevida significativamente menor quando comparadas àquelas com neoplasias benignas. Já que as causas comuns de mortalidade por esta enfermidade, tanto em mulheres quanto em cadelas, estão associadas ao aparecimento de recidivas e metástases do tumor primário, principalmente para linfonodos regionais, pulmões, fígado e baço (DE NARDI *et al.*, 2007; KLOPFLEISCH e GRUBER, 2009).

Considerada multifatorial, a etiologia das neoplasias mamárias está relacionada a fatores genéticos, ambientais, nutricionais e principalmente hormonais (PERSSON, 2000; SILVA *et al.*, 2004). Os hormônios sexuais atuam sobre as glândulas mamárias dos carnívoros domésticos durante toda a vida, uma vez que as fêmeas caninas não apresentam menopausa (ZUCCARI *et al.*, 2001).

O efeito dos hormônios no desenvolvimento da neoplasia mamária pode ser avaliado pela ocorrência de tumores conforme a fase hormonal em que as fêmeas são

submetidas à ovariectomia (BICALHO, 2012; FELICIANO *et al.*, 2012). A castração antes do primeiro estro reduz o risco do desenvolvimento de neoplasia mamária a menos de 0,5% (FOSSUM *et al.*, 2008; SORENMO *et al.*, 2013). Este risco aumenta para 8% quando é realizada após o primeiro cio e para 26% quando efetuada após o segundo cio (FONSECA E DALECK, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2003; FOSSUM *et al.*, 2008).

Comprovou-se também que a exposição a doses farmacológicas de hormônios exógenos é capaz de elevar o risco de desenvolvimento de tumores mamários em cadelas, aumentando de duas a três vezes a chance de desenvolvimento de neoplasia mamária (SORENMO *et al.*, 2013).

Os análogos sintéticos da progesterona, denominados progestágenos, são substâncias com ação similar ao hormônio natural, porém, com efeito mais prolongado (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Mesmo em doses terapêuticas, o uso desses fármacos pode provocar efeitos indesejáveis, como hiperplasia endometrial cística podendo levar à piometra, retenção e morte fetal, e induzir a hiperplasia mamária podendo evoluir para o desenvolvimento de pseudociese e tumores mamários (ENGLAND *et al.*, 1998).

2.2 Alterações mamárias fisiológicas e patológicas não neoplásicas

Outros tipos de alterações mamárias fisiológicas, como a hiperplasia gestacional e a lactação, ou patológicas não neoplásicas, como a pseudociese e a mastite, também ocorrem a partir da influência hormonal sobre o tecido mamário (GOBELLO, 2001). A atividade ovariana cíclica resulta na produção de estrogênio e progesterona. O estrogênio, juntamente com o hormônio do crescimento e os esteroides suprarrenais, são os responsáveis pela proliferação do sistema de ductos mamários. A progesterona e a prolactina atuam no desenvolvimento dos alvéolos na porção terminal dos ductos da mama, levando à expansão da glândula mamária (KLEIN, 2014).

Embora o desenvolvimento da glândula mamária tenha início juntamente com o começo da puberdade, a glândula permanece relativamente subdesenvolvida até a ocorrência da gestação. O desenvolvimento torna-se evidente a partir da metade da gestação e a secreção de leite geralmente inicia-se durante o período final da gestação (REECE, 2015).

Investigações neste âmbito estabeleceram como hipótese provável que a estimulação hormonal das células dos alvéolos mamários conduz a condição (ou lesão) pré-neoplásica, associada ao aumento do risco de desenvolvimento tumoral (MISDORP,

2002). Corroborando com estes dados, outros autores também citam que as neoplasias mamárias etiologicamente desenvolvem-se devido à influência hormonal, acometendo fêmeas não castradas, castradas após váriosaios, fêmeas com histórico de utilização de progestágenos, com distúrbios endócrinos, comoaios irregulares e pseudociese, e com distúrbios inflamatórios, como a mastite (O'KEEFE, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2003; SILVA, 2006; PINTO, 2009; RIBAS *et al.*, 2012).

2.3 Marcadores tumorais

Com o objetivo de se realizar o diagnóstico precoce das neoplasias mamárias, os marcadores tumorais vêm sendo estudados. Eles são, em sua maioria, proteínas ou pedaços de proteínas, também conhecidos por marcadores biológicos, presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos. E, a formação e o crescimento de células neoplásicas levam ao aparecimento e/ou alterações em suas concentrações (CAPELOZZI, 2001; SOUZA, 2002; MATTOS *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2007).

Marcadores tumorais séricos são aqueles detectados no sangue periférico de pacientes com câncer. Sua avaliação pode ser empregada no manejo clínico de pacientes com câncer, auxiliando no diagnóstico, estadiamento, na avaliação da resposta terapêutica, detecção de recidivas e no prognóstico (ALONZO, 2005; MATTOS *et al.*, 2005; SILVEIRA, 2005).

Em seres humanos, tanto para o câncer de mama como para outras neoplasias malignas, o uso de marcadores sorológicos foi introduzido a fim de auxiliar o acompanhamento de pacientes desde o diagnóstico até o término do tratamento, sendo útil na detecção precoce de recidivas, além de contribuir para diminuir o desgaste físico e emocional inerentes aos exames utilizados para o acompanhamento dos pacientes (HARRIS *et al.*, 2007).

O marcador ideal deveria ser altamente específico para determinado tipo de neoplasia e suficientemente sensível para detectar a presença de pequeno número de células neoplásicas, permitindo o diagnóstico precoce, em estudos populacionais (ANDRIOLO, 2008). No entanto, até o momento não existe um marcador tumoral perfeito, mas proteínas com a maioria destas características estão disponíveis para auxiliar os oncologistas no acompanhamento dos pacientes previamente diagnosticados (JACOBS & HASKELL, 1991; ANDRIOLO, 2008).

Numerosos marcadores tumorais séricos têm sido descritos para uso no câncer de mama, incluindo as mucinas (CA 15-3, BR27.29), proteínas oncofetais (antígeno

cancinoembrionário - CEA), oncoproteínas (c-erbB2, c-myc e p53) e citoqueratinas (TPA e TPS). Desses, o CEA e CA 15-3 são os mais indicados na prática clínica de neoplasias mamárias (CHEUNG *et al.*, 2000; MOLINA *et al.*, 2005).

Na tentativa de aumentar a especificidade e sensibilidade dos testes, o Grupo Europeu de Marcadores Tumorais (EGTM) publicou a recomendação para o acompanhamento de pacientes com câncer de mama utilizando a combinação de dois marcadores tumorais séricos: o CEA e o CA 15-3 (MOLINA *et al.*, 2005). Portanto, dentre os marcadores sorológicos mais estudados, o CA 15-3 e o CEA são os indicados como marcadores mais adequados para câncer de mama em mulheres (MARIE *et al.*, 2011).

Marchesi *et al.* (2010) realizaram um trabalho de avaliação da concentração sérica e plasmática do CA 15-3 em cães, com o objetivo de determinar seu valor de referência para a espécie. O estudo avaliou o marcador sérico em grupos de animais saudáveis e com diferentes lesões neoplásicas. Porém, devido à diversidade dos tipos tumorais e a não especificidade para o câncer de mama, não foi possível estabelecer um parâmetro de comparação para o marcador em cadelas portadoras de neoplasias mamárias.

Contudo, o estudo de Manuali *et al.* (2012), constatou que o aumento dos níveis séricos do CA 15-3 teve correlação significativa com o tipo histológico do tumor de mama em cadelas, quanto mais agressiva a neoplasia, maior o aumento do marcador. E, Campos *et al.* (2012) demonstraram que a concentração sérica do marcador tumoral CA15-3 se apresentou significativamente aumentada no grupo de cadelas com câncer de mama e metástase à distância quando comparado aos grupos de cadelas sem câncer de mama e cadelas com câncer de mama sem metástase.

Ainda, um estudo recente realizado em cadelas, demonstrou que houve diferença estatística significativa nos valores do CA 15-3 antes e depois da remoção cirúrgica do tumor mamário, indicando que a concentração deste marcador está ligada a presença da neoplasia no animal, sendo uma escolha interessante para o acompanhamento do paciente (ROBERTO *et al.*, 2018).

2.3.1 Antígeno carcinoembrionário - CEA

Um dos primeiros marcadores estudados e utilizados foi o antígeno carcinoembrionário (CEA). Ele tem sido extensivamente estudado desde sua identificação, em 1965. É uma glicoproteína com peso molecular de 180 Kd pertencente à família das imunoglobulinas (SOUZA, 2002).

Originalmente o CEA foi descrito como presente em adenocarcinoma de cólon e reto, mas ausente em tecido colônico adulto normal (ALMEIDA *et al.*, 2007). Na medicina humana é frequentemente usado para o segmento de pacientes com câncer colo retal e pulmonar (ALMEIDA *et al.*, 2007), mas também está aumentado em adenocarcinomas de mama em mulheres (VON KLEIST *et al.*, 1995; SOUZA, 2002). Diante disso, ele não é considerado um antígeno órgão específico, pois sua detecção no soro correlaciona-se com várias neoplasias malignas (HARRIS *et al.*, 2007).

O marcador tumoral CEA é utilizado para estabelecer o prognóstico de mulheres com neoplasias mamárias no pré-operatório, bem como no acompanhamento pós-operatório de recidivas e metástases. Ele também é muito utilizado para o monitoramento de mulheres com câncer de mama metastático (VERONESI *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2014).

A frequência com que o nível de CEA está elevado e o valor atingido depende da extensão da doença e do seu grau de diferenciação (MAGRO & BENTO, 1997). Estudos demonstram que de 35% a 50% das mulheres com câncer de mama apresentam elevação na concentração sanguínea deste antígeno (ALMEIDA *et al.*, 2007). Ainda, estudos mais recentes relatam que o marcador CEA está aumentado no soro da maioria das mulheres com neoplasia mamária quando comparado às mulheres saudáveis, e também aumenta quando há metástase em linfonodo regional (WANG *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2014).

Segundo o consenso da American Society Clinical Oncology (ASCO), realizado em 2007 (HARRIS *et al.*, 2007), seu uso é recomendado em câncer de mama para avaliação da resposta ao tratamento, indicando falha do tratamento quando apresentar-se elevado entre as primeiras quatro a seis semanas após o início da quimioterapia. Contudo, sua especificidade e sensibilidade aumentam quando associado a outro marcador tumoral (NICOLINI *et al.*, 2006) podendo ser útil, com maior eficácia, para monitorar a remoção cirúrgica do tumor, o tratamento e as recidivas (PARK *et al.*, 2008).

Em humanos, as elevações do CEA também foram relatadas em distúrbios não neoplásicos, como: cirrose alcoólica, doença de Crohn, doenças hepáticas, doenças intestinais, bronquite, tabagismo, insuficiência renal e doença fibrocística da mama (FLETCHER, 1986; GOLDMAN E AUSIELLO, 2005; HARRIS *et al.*, 2007).

Na medicina veterinária, não há relatos do uso de marcador tumoral sorológico na prática clínica, e existem poucos trabalhos a respeito. Marchesi *et al* (2007) iniciaram um estudo com a finalidade de se estabelecer o valor de referência para CEA sérico na espécie canina, mas não obtiveram êxito devido a não detecção de algumas dosagens pela baixa sensibilidade do reagente.

Por outro lado, Balint *et al* (2008) realizaram a avaliação do nível sérico de CEA em caninos e felinos com diversas neoplasias, das quais duas eram carcinomas mamários. Neste grupo, as concentrações séricas de CEA estavam pelo menos duas vezes mais altas que o valor de referência estabelecido no trabalho. Porém, os grupos eram heterogêneos englobando diferentes espécies, com ambos os sexos, e vários tipos de tumores e não foi possível estabelecer um direcionamento preciso para o uso do marcador.

Campos *et al.* (2012) não observaram diferença estatística significativa nas dosagens do CEA entre grupos de cadelas sem neoplasia, cadelas com neoplasia mamária e cadelas com neoplasia mamária com metástase. Porém, outra pesquisa mais recente realizou a dosagem do CEA em cadelas com neoplasias mamárias com e sem metástase e observou aumento do marcador nestes dois grupos em comparação ao grupo de cadelas saudáveis (SENHORELLO, 2017).

Apesar da alta frequência do carcinoma mamário na espécie canina e das semelhanças identificadas com a espécie humana, o número de pesquisas relacionadas a esses marcadores na medicina veterinária é escasso. Cadelas portadoras de tumores mamários devem ser submetidas à cirurgia, não sem antes realizar exames para o estadiamento e monitoramento da doença (CASSALI *et al.*, 2014).

A possibilidade da utilização de marcadores menos invasivos que auxiliem no estadiamento e, que possam indicar precocemente a recidiva tumoral ou o surgimento de um foco metastático, torna-se cada vez mais útil e necessária. Desta forma, alguns estudos com marcadores sorológicos em neoplasias mamárias caninas como os de Marchesi *et al.* (2010), Campos *et al.* (2012), Manuali *et al.* (2012), Valencakova-Agyagosova *et al.* (2012), Senhorello (2017) e Roberto *et al.* (2018) vêm sendo realizados, são de grande interesse e devem ser estimulados.

Há poucos dados sobre os valores do marcador tumoral CEA na população canina e ainda mais escassas informações sobre seu uso em outras alterações mamárias, como lactação, pseudociese e mastite. Esta pesquisa objetiva contribuir para a introdução das análises de marcadores tumorais na rotina da clínica de pequenos animais que poderão ser úteis como auxiliares no estadiamento, prognóstico e acompanhamento pós-operatório de cadelas portadoras de neoplasias mamárias.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a variação do marcador tumoral CEA em cadelas híidas e portadoras de doenças mamárias neoplásicas e não neoplásicas atendidas pela Clínica Escola Veterinária da UNICENTRO.

3.2 Objetivos específicos

- Definir se há aumento dos valores do marcador CEA em doenças e/ou alterações mamárias não neoplásicas;

- Definir se há diferença significativa nos valores do marcador entre cadelas híidas, cadelas com alterações mamárias não neoplásicas e cadelas portadoras de neoplasia mamária;

- Definir se o marcador tumoral CEA é específico para identificar apenas alterações neoplásicas da mama.

4. ARTIGO CIENTÍFICO (Artigo de acordo com as normas da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia)

Diferença dos níveis séricos do marcador tumoral CEA em cadelas (*Canis lupus familiaris*) com alterações mamárias não neoplásicas e neoplasias mamárias

Differences in serum levels of CEA tumor marker in female dogs (*Canis lupus familiaris*) with non-neoplastic mammary changes and mammary neoplasia

RESUMO

O antígeno CEA é uma glicoproteína presente no soro utilizado no acompanhamento de mulheres com câncer de mama. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variação do marcador tumoral CEA em cadelas híidas, com neoplasias mamárias e com alterações mamárias não neoplásicas, definindo se estas alterações podem alterar os valores do marcador. Assim, esperou-se constatar se o CEA é específico para identificar apenas alterações neoplásicas da mama, contribuindo para futuramente utilizá-lo no estadiamento, monitoramento e prognóstico dos pacientes. Foi realizada a dosagem sérica do CEA em 30 cadelas, sendo 10 cadelas híidas sem qualquer tipo de alteração mamária (G1 - controle); 10 cadelas com alterações mamárias não neoplásicas, como lactação, pseudociese ou mastite (G2) e 10 cadelas com neoplasia mamária (G3). Nos grupos, pode-se observar uma média de valor das dosagens de 0,12 ($\pm 0,12$) ng/mL no G1 (grupo controle), uma média de 0,68 ($\pm 0,23$) ng/mL no G2 e, no G3 foi observada uma média de 1,29 ($\pm 0,14$) ng/mL. Nas comparações múltiplas das médias, utilizou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$). Através deste estudo, observou-se diferença estatística significativa nos valores do CEA entre os três grupos do estudo. As alterações mamárias não neoplásicas podem aumentar os valores do marcador, porém não tanto quanto as neoplasias mamárias. Pode-se concluir que o CEA é um marcador que pode ser utilizado para neoplasias mamárias em cadelas, porém ele pode se mostrar aumentado em alterações mamárias não neoplásicas, faltando uma melhor definição dos seus valores de referência.

Palavras-chave: estadiamento; prognóstico; pseudociese; lactação; antígeno carcinoembrionário

ABSTRACT

CEA antigen is a serum glycoprotein used to monitoring women with breast cancer. The aims of this study were to evaluate the variations of the CEA tumour marker in healthy bitches, with mammary tumors and with non-neoplastic mammary changes, and to determine if these alterations can alter the values of the marker. Consequently, would be possible to verify if the CEA was specific to identify the specificity for mammary neoplastic alterations, contributing to the future use in the staging, monitoring and prognosis of the patients. CEA serum levels were determined in 30 female dogs: 10 healthy ones without any type of mammary alteration (G1 – control); 10 with non-neoplastic mammary changes, such as lactation, pseudopregnancy or mastitis (G2) and 10 bitches with mammary neoplasia (G3). As a result, an average of 0.12 (± 0.12) ng/mL in G1 (control), an average of 0.68 (± 0.23) ng/mL in G2 and an average of 1.29 (± 0.14) ng/mL in G3 was achieved. In the multiple comparisons of averages, the Tukeys test was used ($p < 0,05$). Through this study, a significant statistical difference was observed in the CEA values between healthy bitches, with mammary alterations and with mammary neoplasia. Base on this, can be concluded that CEA is a marker that can be used for mammary neoplasia in female dogs, however, it may be increased in non-neoplastic mammary changes, lacking a better definition of its reference values.

Keywords: staging; prognosis; pseudopregnancy; lactation, carcinoembryonic antigen

INTRODUÇÃO

Com alta incidência nas mulheres, as neoplasias mamárias são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (RIBEIRO, 2012). Elas também são o tipo mais comum de neoplasia em cadelas inteiras, representam de 50% a 70% de todos os tumores que acometem a espécie, e possuem grande importância dentro da clínica de pequenos animais (SORENMO *et al.*, 2013; CASSALI *et al.*, 2014).

Existem semelhanças nas alterações bioquímicas, na epidemiologia e na clínica entre cães e humanos no que diz respeito ao desenvolvimento das neoplasias mamárias (GARRIDO, 2011). Assim, além da sua relevância na medicina veterinária, as cadelas vêm sendo utilizadas como modelo para o estudo do câncer de mama na mulher (GARRIDO 2011; FELICIANO *et al.* 2012).

O efeito dos hormônios no desenvolvimento da neoplasia mamária pode ser avaliado pela ocorrência de tumores conforme a fase hormonal em que as fêmeas são

submetidas à ovariectomia (BICALHO, 2012; FELICIANO *et al.*, 2012). A castração antes do primeiro estro reduz o risco do desenvolvimento de neoplasia mamária a menos de 0,5% (FOSSUM *et al.*, 2008; SORENMO *et al.*, 2013). Este risco aumenta para 8% quando é realizada após o primeiro cio e para 26% quando efetuada após o segundo cio (FONSECA E DALECK, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2003; FOSSUM *et al.*, 2008).

Comprovou-se também que a exposição a doses farmacológicas de hormônios exógenos é capaz de aumentar o risco de desenvolvimento de tumores mamários em cadelas, aumentando de duas a três vezes a chance de desenvolvimento de neoplasia mamária (SOENMO *et al.*, 2013).

Outros tipos de alterações mamárias fisiológicas, como a hiperplasia gestacional e a lactação, ou patológicas não neoplásicas, como a pseudociese e a mastite, também ocorrem a partir da influência hormonal sobre o tecido mamário (GOBELLO, 2001). Investigações neste âmbito estabeleceram como hipótese provável que a estimulação hormonal das células dos alvéolos mamários conduz a condição (ou lesão) pré-neoplásica, associada ao aumento do risco do desenvolvimento tumoral (MISDORP, 2002).

Corroborando com estes dados, outros autores também citam que as neoplasias mamárias etiologicamente desenvolvem-se devido à influência hormonal, acometendo fêmeas não castradas, castradas após vários cios, fêmeas com histórico de utilização de progestágenos, com distúrbios endócrinos, como cios irregulares e pseudociese, e com distúrbios inflamatórios, como a mastite (O'KEEFE, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2003; SILVA, 2006; PINTO, 2009; RIBAS *et al.*, 2012).

Com o objetivo de se realizar o diagnóstico precoce das neoplasias mamárias, os marcadores tumorais vêm sendo estudados. Os marcadores tumorais séricos são aqueles detectados no sangue periférico de pacientes com câncer. Sua avaliação pode ser empregada no manejo clínico de pacientes com câncer, auxiliando no diagnóstico, no estadiamento, na avaliação da resposta terapêutica, na detecção de recidivas e no prognóstico (ALONZO, 2005; MATOS *et al.*, 2005; SILVEIRA, 2005). Sua utilização é possível pois a formação e o crescimento de células neoplásicas levam ao aparecimento e/ou alterações em suas concentrações (CAPELOZZI, 2001; SOUZA, 2002; MATTOS *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2007).

Numerosos marcadores tumorais séricos têm sido descritos para o uso no câncer de mama, incluindo as mucinas (CA 15-3, BR27.29), proteínas oncofetais (antígeno carcinoembrionário - CEA), oncoproteínas (c-erbB2, c-myc e p53) e citoqueratinas (TPA

e TPS). Desses marcadores, o CEA e o CA 15-3 são os mais indicados na prática clínica de neoplasias mamárias em humanos (CHEUNG *et al.*, 2000; MOLINA, 2005).

O estudo de Manuali *et al.* (2012), constatou que o aumento dos níveis séricos do CA 15-3 teve correlação significativa com o tipo histológico do tumor de mama em cadelas, quanto mais agressiva a neoplasia, maior o aumento do marcador. E, Campos *et al.* (2012) demonstraram que a concentração sérica do marcador tumoral CA15-3 se apresentou significativamente aumentada no grupo de cadelas com câncer de mama e metástase à distância quando comparado aos grupos de cadelas sem câncer de mama e cadelas com câncer de mama sem metástase.

Ainda, um estudo recente realizado em cadelas, demonstrou que houve diferença estatística significativa nos valores do CA 15-3 antes e depois da remoção cirúrgica do tumor mamário, indicando que a concentração deste marcador está ligada a presença da neoplasia no animal, podendo ser adotado para o acompanhamento do paciente canino (ROBERTO *et al.*, 2018). Contudo, segundo a nossa experiência com o marcador CA15-3, a ausência de kit específico para a espécie canina e disparidades de resultados de acordo com a técnica empregada tornam o emprego deste marcador de difícil utilização, no momento, no Brasil.

Um dos primeiros marcadores estudados e utilizados foi o antígeno carcinoembrionário (CEA). Originalmente, o CEA foi descrito como presente em adenocarcinoma de cólon e reto, mas ausente em tecido colônico adulto normal (ALMEIDA *et al.*, 2007). Porém, o CEA também está aumentado em adenocarcinomas de mama em mulheres (VON KLEIST *et al.*, 1995; SOUZA, 2002). Sendo assim, ele é utilizado para estabelecer o prognóstico de mulheres com neoplasias mamárias no pré-operatório, bem como no acompanhamento pós-operatório de recidivas e metástases (VERONESI *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2014). Estudos relatam que o marcador CEA está aumentado no soro da maioria das mulheres com neoplasia mamária quando comparado às mulheres saudáveis, e também aumenta quando há metástase em linfonodo regional (WANG *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2014).

Em humanos, as elevações do CEA também foram relatadas em distúrbios não neoplásicos, como: cirrose alcoólica, doença de Crohn, doenças hepáticas, doenças intestinais, bronquite, tabagismo, insuficiência renal e doença fibrocística da mama (FLETCHER, 1986; GOLDMAN E AUSIELLO, 2005; HARRIS *et al.*, 2007).

Na medicina veterinária não há relatos do uso de marcador tumoral sorológico na prática clínica, e existem poucos trabalhos a seu respeito. Marchesi *et al.* (2007) iniciaram

um estudo com a finalidade de se estabelecer o valor de referência para CEA sérico na espécie canina, mas não obtiveram êxito devido a não detecção de algumas dosagens pela baixa sensibilidade do reagente.

Por outro lado, Balint et al (2008) realizaram a avaliação do nível sérico de CEA em caninos e felinos com diversas neoplasias, das quais duas eram carcinomas mamários. Neste grupo, as concentrações séricas de CEA estavam pelo menos duas vezes mais altas que o valor de referência estabelecido no trabalho. Porém, os grupos eram heterogêneos englobando diferentes espécies, com ambos os sexos, e vários tipos de tumores e não foi possível estabelecer o direcionamento preciso para o uso do marcador.

Campos *et al.* (2012) não observaram diferença estatística significativa nas dosagens do CEA entre grupos de cadelas sem neoplasia, cadelas com neoplasia mamária e cadelas com neoplasia mamária com metástase. Porém, outra pesquisa mais recente realizou a dosagem do CEA em cadelas com neoplasias mamárias com e sem metástase e observou aumento do marcador nestes dois grupos em comparação ao grupo de cadelas saudáveis (SENHORELLO, 2017).

A possibilidade da utilização de marcadores menos invasivos que auxiliem no estadiamento e, que possam indicar precocemente a recidiva tumoral ou o surgimento de foco metastático, torna-se cada vez mais útil e necessária. Desta forma, alguns estudos com marcadores sorológicos em neoplasias mamárias caninas como os de Marchesi *et al.* (2010), Campos *et al.* (2012), Manuali *et al.* (2012), Valencakova-Agyagosova *et al.* (2012), Senhorello (2017) e Roberto *et al.* (2018) vem sendo realizados, são de grande interesse e devem ser estimulados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a concentração sérica do marcador tumoral CEA em cadelas híginas, com neoplasias mamárias e com alterações mamárias não neoplásicas, definindo se estas alterações podem interferir ou alterar os valores do marcador. E assim, constatar se o CEA é específico para identificar apenas alterações neoplásicas da mama, contribuindo para sua utilização no estadiamento, monitoramento e prognóstico dos pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNICENTRO (protocolo nº 009/2018) e considerado aprovado através do Ofício

nº 014/2018. Os proprietários que aceitaram que seus animais participassem do projeto de pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

Neste estudo, foi realizada a quantificação sérica do marcador tumoral CEA em fêmeas da espécie canina. Foram utilizadas 30 cadelas, sem predileção por raça ou idade, oriundas da rotina de atendimento da Clínica Escola Veterinária da UNICENTRO, *Campus* CEDETEG, em Guarapuava/PR. Os animais foram divididos em três grupos:

Grupo 1 (G1): grupo controle composto por 10 cadelas híginas, sem qualquer tipo de alteração nas mamas;

Grupo 2 (G2): composto por 10 cadelas com alterações fisiológicas ou patológicas em mamas (mas não neoplásicas) como lactação; pseudociese ou mastite;

Grupo 3 (G3): composto por 10 cadelas com neoplasia mamária.

Todos os animais participantes do projeto passaram por avaliação clínica, com o exame da glândula mamária em busca de qualquer anomalia e, definindo assim a qual grupo cada cadela pertencia. As alterações fisiológicas ou patológicas não neoplásicas das cadelas do G2 foram diagnosticadas clinicamente no momento da consulta e os animais foram acompanhados durante o tratamento para confirmação do diagnóstico.

As cadelas do G3, nas quais detectou-se nódulos nas mamas, foram encaminhadas para o setor de cirurgia, onde foram realizados os exames pré-operatórios: hemograma, exames bioquímicos (creatinina e alanina aminotransferase – ALT), e radiografias torácicas em 3 projeções para pesquisa de metástases. Os animais que apresentaram alterações nestes exames não fizeram parte do estudo.

Os animais selecionados e cujos proprietários autorizaram a participação no estudo, foram encaminhados para a coleta de amostra de sangue para a realização do teste sorológico. Foram coletados três mililitros de sangue, por meio de venopunção da veia jugular. As amostras foram centrifugadas e o soro foi armazenado em tubos Eppendorf devidamente identificados e mantidos em freezer a temperatura de -20°C.

As amostras de soro foram enviadas ao Laboratório VetPat¹ em Campinas/SP em caixa térmica com gelo seco para manutenção do congelamento. Os testes de dosagem do marcador tumoral CEA foram realizados em duplicata e de acordo com as recomendações

¹ Endereço: Rua Coronel Manuel de Moraes, 146, Jd. Brasil, CEP: 13073-022 - Campinas/SP - Fones: (19) 4062- 9232/3500-2478 - E-mail: contato@vetpat.com
Responsável técnico: Felipe Augusto Ruiz Sueiro/CRMV-SP 10800

do fabricante. Foi empregado o kit ELISA humano para CEA (AccuBind ELISA Kits - MONOBIND INC) e o equipamento para leitura foi o *ELISYS UNO human*.

Os animais do G3 foram então submetidos a exérese cirúrgica da(s) neoplasia(s) mamária(s). As técnicas cirúrgicas realizadas nos animais do G3 foram adotadas de acordo com as mamas envolvidas e as características clínicas de cada paciente, sendo realizadas nos animais participantes deste trabalho a mastectomia total unilateral ou a mastectomia regional. Após a remoção cirúrgica, as mamas com seus tecidos neoplásicos foram fixadas em formalina a 10% durante o período mínimo de 48 horas e enviadas para realização de exame histopatológico também no Laboratório VetPat¹ em Campinas/SP.

Os dados obtidos da análise do marcador CEA passaram no teste de normalidade Shapiro-wilk após sofrerem transformação logarítmica. As variáveis foram, então, tabuladas e submetidas à análise de variância para delineamento inteiramente ao acaso e com valor de $p < 0,05$. Nas comparações múltiplas das médias, utilizou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$). Para essas análises foi utilizado o programa computacional de análises estatísticas SISVAR®.

RESULTADOS

A média de idade das cadelas hígdas foi de 6 ($\pm 2,8$) anos, das cadelas com alterações mamárias não neoplásicas foi de 5 (± 3) anos, e das com neoplasias mamárias foi de 10 ($\pm 2,1$) anos. As cadelas sem raça definida (SRD) foram as mais encontradas nos três grupos do estudo. Nos exames pré-operatórios realizados no G3, nenhum animal apresentou alteração em imagem radiográfica que fosse compatível com metástase, e os exames hematológicos e bioquímicos apresentaram-se dentro dos valores de normalidade.

Durante os atendimentos, no G2 foram diagnosticadas quatro cadelas em lactação (40%), três cadelas com mastite (30%) e três cadelas com pseudociese (30%) (Tabela 1). Dos 10 animais pesquisados no G3, nove (90%) apresentaram neoplasia malignas e um (10%) apresentou neoplasia benigna. E o tipo histológico mais frequente de neoplasia encontrado foi o carcinoma mamário misto (5/10; 50%) (Tabela 2).

Tabela 1: Frequência dos tipos de alterações mamárias não neoplásicas diagnosticadas no G2 (n=10).

Diagnóstico	Frequência	%
Lactação	4	40
Mastite	3	30
Pseudociese	3	30
Total	10	100

Tabela 2: Frequência de tipos histológicos dos tumores mamários das cadelas do G3 (n=10).

Tipo histológico	Frequência	%
Carcinoma mamário misto	5	50
Carcinoma tubular	2	20
Sarcoma mamário	1	10
Osteossarcoma mamário	1	10
Adenoma mamário	1	10
Total	10	100

As dosagens do marcador CEA não apresentaram distribuição normal, sendo submetidas à transformação logarítmica para análise dos dados. Nos grupos, pode-se observar média de valor das dosagens de 0,12 ($\pm 0,12$) ng/mL no G1 (grupo controle), média de 0,68 ($\pm 0,23$) ng/mL no G2 e, no G3 foi observada média de 1,29 ($\pm 0,14$) ng/mL.

Os valores foram analisados estatisticamente, apresentando diferença significativa entre os três grupos (teste Tukey: $p < 0,05$). Analisando as médias das concentrações séricas do marcador tumoral CEA nos grupos G1, G2 e G3, foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as médias do CEA dos grupos G1 e G2 ($p < 0,05$), dos grupos G2 e G3 ($p < 0,05$) e dos grupos G1 e G3 ($p < 0,05$), ou seja, os três grupos diferiram estatisticamente entre si (Tabela 3).

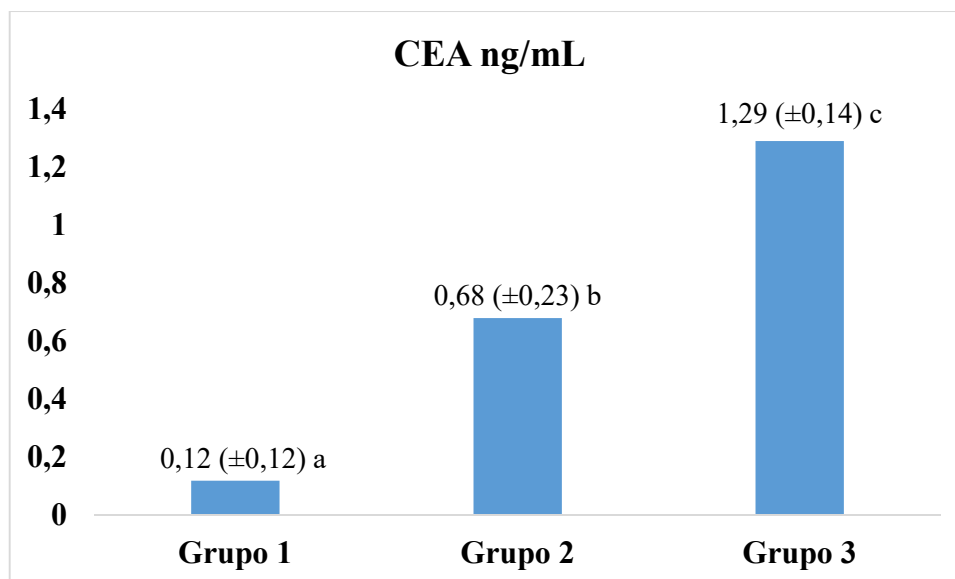
Tabela 3: Média e desvio padrão dos valores das dosagens de CEA no soro de cadelas hígdas (G1), com alterações mamárias não neoplásicas (G2) e com neoplasias mamárias (G3).

Grupos (n)	CEA* (ng/mL)
Grupo 1 (10)	0,12 ±0,12 a
Grupo 2 (10)	0,68 ±0,23 b
Grupo 3 (10)	1,29 ±0,14 c

CEA: antígeno carcinoembrionário. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$). *Houve transformação logarítmica nos valores de CEA.

O G2 apresentou aumento significativo nos valores de CEA quando comparado com o G1 (controle), porém não atingiu valores tão altos como os do G3. O G3 apresentou valores significativamente maiores que os Grupos 1 e 2 (Figura 1).

Figura 1: Valores séricos do marcador tumoral CEA (média e desvio padrão) nas cadelas dos grupos 1 (cadelas hígdas; n=10), grupo 2 (cadelas com alterações mamárias não neoplásicas; n=10) e grupo 3 (cadelas com neoplasias mamárias; n=10).



CEA: antígeno carcinoembrionário. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$). *Houve transformação logarítmica nos valores de CEA.

DISCUSSÃO

Esse trabalho foi realizado com o intuito de buscar um maior conhecimento sobre o marcador tumoral CEA e sobre sua aplicação clínica no estadiamento e no monitoramento de cadelas com neoplasias mamárias.

As cadelas em lactação representaram 40% dos animais do G2. As alterações fisiológicas da mama são decorrentes do estímulo hormonal normal ou exacerbado no tecido mamário. A lactação é uma alteração fisiológica das mamas que ocorre em qualquer cadela inteira em consequência da gestação pela ação dos hormônios estrógeno, progesterona e prolactina (JOHNSTON *et al.*, 2001). A gestação e consequente lactação levam a hiperplasia e hipertrofia do tecido glandular mamário.

As cadelas que apresentam pseudociese também sofrem a ação dos hormônios estrógeno, progesterona e prolactina, com estímulo do tecido mamário e, consequentemente, a expansão da glândula mamária e produção de leite, semelhante ao que ocorre em cadelas prenhes (MARTINS E LOPES, 2005). A pseudociese é considerada de ocorrência comum (GOBELLO *et al.*, 2001), e não apresenta predisposição de raça e idade (JOHNSTON *et al.*, 2001). Peleteiro *et al.* (2011) relataram que a mastite é uma condição incomum em cadelas e não apresenta predisposição racial ou etária. No presente trabalho as alterações patológicas não neoplásicas da mama (pseudociese e mastite) foram mais comumente observadas que as fisiológicas (lactação), correspondendo a 60% das alterações mamárias no G2, não sendo observada predisposição racial ou etária nestes indivíduos, concordando com os estudos citados anteriormente.

As cadelas com neoplasia mamária apresentaram média de idade de 10 ($\pm 2,1$) anos, semelhante ao reportado em outros estudos sobre incidência de neoplasias mamárias como nos trabalhos de Campos *et al.* (2012), Cassali *et al.* (2014) e Kim *et al.* (2016). Em sua maioria eram SRD (sem raça definida), também relatada como a categoria de maior ocorrência nas pesquisas sobre neoplasias mamárias de Oliveira *et al.* (2003), Senhorello (2017) e Roberto *et al.* (2018).

Os animais participantes deste estudo apresentaram neoplasias mamárias espontâneas e 50% destes pacientes com o tipo histológico carcinoma mamário misto. As neoplasias mamárias malignas espontâneas são muito frequentes em fêmeas da espécie canina e a literatura registra o carcinoma mamário misto como tipo histológico mais frequente nas cadelas (MISDORP *et al.*, 1999; CAMPOS *et al.*, 2012; CASSALI *et al.*,

2014), portanto não houve discordância do encontrado no estudo com o descrito pela literatura.

A escassez de valores de referência sobre os marcadores tumorais de mama tornou a análise dos dados deste estudo um desafio. Marchesi *et al.* (2007) iniciaram estudo com a finalidade de estabelecer o valor de referência para o CEA sérico na espécie canina; no entanto, não obtiveram êxito devido a não detecção de algumas dosagens pela baixa sensibilidade do reagente.

No presente estudo foi empregado o kit ELISA humano para CEA (AccuBind ELISA Kits - MONOBIND INC). Como não há disponibilidade de kit diagnóstico espécie/específico, a escolha do kit destinado à espécie humana foi a adotada e pautou-se nas experiências de outros pesquisadores que validaram seu uso em cães como Marchesi *et al.* (2010), Manuali *et al.* (2012), Valencakova-Agyagosova *et al.* (2012) e Senhorello (2017). O kit empregado neste trabalho não apresentou dificuldades quanto a sensibilidade do reagente, demonstrando-se eficaz para utilização na espécie canina.

As neoplasias mamárias de cadelas servem de modelo para o estudo do câncer de mama na mulher devido às semelhanças nas alterações bioquímicas, na epidemiologia e na clínica entre essas espécies no que diz respeito ao desenvolvimento destas neoplasias (GARRIDO 2011; FELICIANO *et al.* 2012). Um estudo recente de Jensen-Jarolim *et al.* (2015) comparou os receptores do CEA em neoplasias de humanos e de cadelas e encontrou semelhanças entre as duas espécies, reafirmando que esses animais representam um ótimo modelo para o estudo da neoplasia mamária humana. Esta semelhança nos receptores fortalece ainda mais a possibilidade do uso de kit CEA humano em cadelas.

No presente estudo, observou-se aumento significativo do marcador CEA em cadelas com alterações mamárias não neoplásicas ($0,68 \pm 0,23$ ng/mL) quando comparado ao grupo controle ($0,12 \pm 0,12$ ng/mL). As alterações mamárias fisiológicas e patológicas não neoplásicas como a lactação, pseudociese e mastite (JOHNSTON *et al.*, 2001; MARTINS E LOPES, 2005), assim como a doença fibrocística da mama em mulheres (também alteração mamária não neoplásica), resultam do estímulo hormonal sobre a glândula mamária (NAZARIO *et al.*, 2005). Sabe-se que a doença fibrocística da mama em mulheres pode elevar os valores do CEA (FLETCHER, 1986; GOLDMAN E AUSIELLO, 2005; HARRIS *et al.*, 2007), e no presente estudo também observamos que alterações mamárias não neoplásicas em cadelas elevaram os valores do marcador.

Erbagci *et al.* (1999) avaliaram em seu estudo se a variação hormonal fisiológica do ciclo menstrual poderia influenciar nos valores dos marcadores tumorais CEA, AFP, CA 19-9, CA 125 e CA 15-3 em mulheres saudáveis. Os resultados revelaram que a fase do ciclo menstrual influenciou nos valores do marcador CA 15-3, porém nos outros marcadores nenhuma variação foi observada. Isto demonstra que alterações hormonais do ciclo não seriam suficientes para alterar os marcadores, e acredita-se que em nosso estudo as alterações mamárias influenciadas pela ação hormonal em maior intensidade durante a lactação, pseudociese e mastite, sejam as responsáveis pelo aumento do marcador CEA.

Contudo, na medicina veterinária esta é a primeira pesquisa que investiga o CEA em distúrbios mamários não neoplásicos de cães, não existindo dados na espécie para serem debatidos ou corroborados com nossos resultados.

Os valores de CEA encontrados foram de $0,12 \pm 0,12$ ng/mL no G1 (controle), $0,68 \pm 0,23$ ng/mL no G2 (cadela com alterações mamárias não neoplásicas) e $1,29 \pm 0,14$ ng/mL no G3 (cadela com neoplasias mamárias). Campos *et al.* (2012), avaliaram 60 cadelas com neoplasias mamárias malignas e não encontraram diferença significativa nos níveis de CEA nas cadelas com neoplasias ($0,29 \pm 0,36$ ng/mL) em comparação com cadelas saudáveis ($0,19 \pm 0,20$ ng/mL). Por outro lado, Senhorello (2017) observou o aumento significativo do marcador CEA em cadelas com carcinomas mamários ($1,90 \pm 0,81$ ng/mL) quando comparadas com cadelas saudáveis ($0,47 \pm 0,38$ ng/mL), concordando com o presente estudo. Acredita-se que a disparidade das técnicas adotadas nos trabalhos foi a responsável pela divergência de resultados. Campos *et al.* (2012) empregaram a técnica de quimioluminescência, e o presente estudo empregou o mesmo kit ELISA humano para dosar o CEA que foi utilizado por Senhorello (2017). Portanto, apesar do mesmo marcador ter sido adotado por Campos *et al.* (2012), a sensibilidade do teste pode ter interferido nos resultados alcançados.

Diante destes dados, constatou-se que as alterações mamárias não neoplásicas podem alterar os valores do CEA. Contudo, apesar da elevação do marcador em alterações mamárias não neoplásicas ter sido observada, houve aumento significativamente maior nos valores do marcador em cadelas com neoplasias mamárias. Com estas informações, podemos indicar que o CEA é um marcador que pode ser utilizado para neoplasias mamárias em cadelas, porém ele também pode se mostrar aumentado, embora em menor escala, em alterações mamárias não neoplásicas.

Apesar dos valores significativos encontrados nesta pesquisa, são necessários mais estudos sobre marcadores tumorais em cães para que valores de referência possam ser estabelecidos e a melhor técnica de detecção seja definida. E assim, futuramente, os marcadores tumorais possam ser incluídos na rotina da clínica de pequenos animais, auxiliando no estadiamento, monitoramento e prognóstico dos pacientes portadores de neoplasias mamárias.

CONCLUSÕES

Por meio deste estudo, observou-se diferença estatística significativa nos valores do marcador tumoral CEA entre cadelas híginas, com alterações mamárias não neoplásicas e com neoplasias mamárias. As alterações mamárias não neoplásicas podem aumentar os valores do marcador, porém não tanto quanto as neoplasias mamárias.

Pode-se concluir que o CEA é um marcador que pode ser utilizado para neoplasias mamárias em cadelas, porém ele pode se mostrar aumentado em alterações mamárias não neoplásicas, faltando uma melhor definição dos seus valores de referência.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. R. C., PEDROSA, N. L., LEITE, J. B. et al. Marcadores Tumorais: Revisão de literatura. *Rev. Bras. de Câncer*. 53 (3): 305-316, 2007.
- ALONZO, T.A. Standards for reporting prognostic tumor marker studies. *J Clin Oncol*. 23(36):9053-9054, 2005.
- BALINT, E.; MANOLESCU, N.; BRASLASU, D. et al. Molecular detection through CEA (carcinoembryonic antigen) of different types of cancer in animal. *Lucrari Stiintifice Medicina Veterinara*. Timioara, v. 51, p. 89- 93, 2008.
- BICALHO, S. R. *Quantificação sérica do marcador tumoral CA 15.3 em cadelas híginas por quimioluminescência*. 2012. 28 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal.
- CAMPOS, L. C.; LAVALLE, G. E.; ESTRELA-LIMA, A. et al. CA15.3, CEA, and LDH in dogs with malignant mammary tumors. *J Vet Int Med*. 26:1383–8, 2012.
- CASSALI, G.D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E. et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors – 2013. *Braz J Vet Pathol*. 7 (2): 38 – 69, 2014.

- CAPELOZZI, V. L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. *J Pneumol.* 27 (6): 321- 28, 2001.
- CHEUNG, K. L.; GRAVES, C. R. L.; ROBERTSON, J. F. R. Tumour marker measurements in the diagnostics and monitoring of breast cancer. *Cancer Treatment Reviews.* v. 26, p. 91- 102, 2000.
- ERBAGCI, A. B.; YILMAZ, N.; KUTLAR, I. Menstrual Cycle Dependent Variability for Serum Tumor Markers CEA, AFP, CA 19-9, CA 125 and CA 15-3 in Healthy Women. *Disease Markers*, 15:259–267, 1999.
- FELICIANO, M. A. R.; JOAO, C. F.; CARDILLI, D. J. et al. Neoplasia mamária em cadelas – revisão de literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária.* Ano IX. n. 18, 2012.
- FLETCHER, R. H. Carcinoembryonic antigen. *Ann Intern Med.* 104:66-73, 1986.
- FONSECA, C. S. & DALECK, C. R. Neoplasias mamarias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. *Ciência Rural.* 30 (4): 731-735, 2000.
- FOSSUM, T. W., HEDLUND, C. S., HULSE, D. A. et al. *Cirurgia de Pequenos Animais.* 2 ed. p. 1390. Roca, São Paulo, 2008.
- GARRIDO, E. *Determinação dos valores plasmáticos de osteopontina em cães com tumores mamários metastáticos ou não. Correlações clínicas e anatomopatológicas.* 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal.
- GOBELLO, C.; CONCANNON, P. W.; VERSTEGEN, J. P. Canine pseudopregnancy: a review. In: Concannon, P.W.; England, G.; Verstegen, J.; Linde-Forsberg, C. (Ed.) *Recent advances in small animal reproduction.* Ithaca: International Veterinary Information Service, 2001.
- GOLDMAN, L. C.; AUSIELLO, D. Tratado de medicina interna. In: Cooper DL. *Marcadores tumorais.* v. 2. 22^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; p.1309-312, 2005.
- HARRIS L.; FRITSCH H.; MENNEL R. American Society of Clinical Oncology 2007: Update of recommendations for the use tumour markers in breast cancer. *Journal Clinical Oncology*, v. 25, p.5287–5312, 2007.
- JENSEN-JAROLIM, E.; FAZEKAS, J. SINGER, J. Crosstalk of carcinoembryonic antigen and transforming growth factor- β via their receptors: comparing human and canine cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 64:531–537, 2015.

- JOHNSTON, S. D.; ROOT-KUSTRITZ, M. R.; OLSON, P. N. S. Canine and feline theriogenology. Philadelphia: WB Saunders, 2001.
- KIM, H. W.; LIM, H. Y.; SHIN, J. I. et al. Breed and age-related differences in canine mammary tumors. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 80, n. 2, p. 146-155, 2016.
- KLEIN, B. G. Cunningham tratado de fisiologia veterinária. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- MANUALI, E.; DE GIUSEPPE, A.; FELIZIANI, F. et al. CA 15-3 cell lines and tissue expression in canine mammary cancer and the correlation between serum levels and tumour histological grade. *BMC Vet Res*, p. 8-86, 2012.
- MARCHESI, M.; CONTI, M.B.; PIERAMATI, C.; MANGILI, V.; FRUGANTIET, V. 54 Assessment and behavior of alphafetoprotein (AFP), antigen cancer 15/3 (CA 15/3), carcinoembryonal antigen (CEA) in clinical oncology of the dog: preliminary study. *Veterinary Research Communication*. v. 31 Suppl 1, p. 301-4, Aug 2007.
- MARCHESI, M. C.; MANUALI, E.; PACIFICO, E. et al. Cancer antigen 15/3: possible diagnostic use in veterinary clinical oncology. Preliminary study. *Veterinary Research Communication*, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. S103-S106, 2010.
- MARTINS, L. R.; LOPES, M. D. Pseudociese canina. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.29, n.3/4, p.137-141, jul/dez. 2005.
- MATTOS, L.L.; MACHADO, L.N.; SUGUIYAMA, M.M. et al. Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais. *Arq med ABC*. 30(1):19-25, 2005.
- MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E. et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. 2nd series. v. VII. Washington DC, Arm. Forc. Inst. Pathol. American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology. p. 1-59, 1999.
- MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: D. J. Meuten (Ed.), *Tumors in domestic animals* (4th ed., p. 575-606). Iowa: Blackwell Publishing. 2002.
- MOLINA, R. et al. Tumor markers in breast cancer - European Group on Tumor Markers recommendations. *Tumour Biology*, v. 26, n. 6, p. 281-93, 2005 Nov/Dec 2005.
- NAZARIO, A. C. P.; ARAUJO NETO, J. T. Alterações funcionais benignas da mama. In: Baracat EC, Lima GR. *Guia de ginecologia*. São Paulo: Manole; p. 629-33, 2005.

- O'KEEFE, D. A. Tumores do sistema genital e das glândulas mamárias. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. (Eds). Tratado de Medicina Interna Veterinária. 4 ed. São Paulo: Manole, p. 2344-2354. 1997.
- OLIVEIRA, L. O., OLIVEIRA, R. T., LORETTI, A. P. et al. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Sci Vet.* 31(2): 105 – 110, 2003.
- PELETEIRO, M. C.; MARCOS, R.; SANTO, M. et al. Glândula mamária. In: M. C. Peleteiro & T. Carvalho (Eds.), Atlas de Citologia Veterinária (1ª 77 Ed., pp. 215–231). Lisboa: Lidel, 2011.
- PINTO, R. M. M. O. *Neoplasias Mamárias em Cadelas e Gatas*. 2009. 90f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- RIBAS, C. R., PETERSOM, T. D., FARIA, M. R. et al. Alterações clínicas relevantes em cadelas com neoplasias mamárias estadiadas. *Archives of Veterinary Science.* v. 17, n.1, p.60-68, 2012.
- RIBEIRO, L.G.R. *Carcinoma inflamatório de mama em cadela: caracterização da resposta inflamatória, achados clínicos e anatomohistopatológicos*. 2012. 142f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA.
- ROBERTO, G. B., ZILIOOTTO, L., SEKI, M. C. Avaliação comparativa de dosagem do marcador tumoral CA 15-3 em cadelas (*Canis lupus familiaris*) hígdas e com neoplasia mamária. *Pesq. Vet. Bras.* 38(9):1800-1807, setembro/2018.
- SENHORELLO, I. L. S. *Valor clínico do CEA e da AFP na detecção de carcinoma de mama em cadelas*. 2017. 32f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal.
- SILVA, J. R. S. *Mastectomia em Cadelas - Variações da Técnica Segundo a drenagem Linfática da Cadeia Mamária - Revisão de Literatura*. 2006. 45f. Monografia (Pós-Graduação “Latu-sensu” em Clínica Cirúrgica em Pequenos Animais) – Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro.
- SILVEIRA, A.S. Câncer ginecológico: Diagnóstico e tratamento. In: Gil RA. Fatores prognósticos, preditivos e marcadores tumorais no câncer ginecológico. Florianópolis: UFSC; 135-52, 2005.

SORENMO, K.U et al. Tumors of the Mammary Gland. In: Withrow, S.J. & Macewen, E.G. *Small Animal Clinical Oncology*. 5th ed. St Louis: Elsevier, 2013. cap. 27, p. 538 – 556.

SOUZA, J. V. Marker mucinous cancer associated. *Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, v. 46, n. 1,2, p. 70- 83, Jan/Jun 2002.

VALENCAKOVA-AGYAGOSOVA, A. et al. Determination of carcinoembryonic antigen and cancer antigen (CA 15-3) in bitches with tumours on mammary gland: preliminary report. *Veterinary and comparative oncology*, v. 12, n. 3, p. 205-214, 2012.

VERONESI, U.; LUINI A.; COSTA, A.; ANDREOLI, C. *Mastologia oncológica*. Milão: Medsi; 2002.

VON KLEIST, S.; MIGULE, I.; HALLA, B. Possible function of CEA as cell-contact inhibitory molecule. *Anticancer Res.* **15**: 1889– 1894, 1995.

WANG, G.; QIN, Y.; ZHANG, J. et al. Nipple discharge of CA15-3, CA125, CEA and TSGF as a new biomarker panel for breast cancer. *International journal of molecular sciences*, v. 15, n. 6, p. 9546-9565, 2014.

WU, S. G.; HE, Z. Y.; ZHOU, J. et al. Serum levels of CEA and CA15-3 in different molecular subtypes and prognostic value in Chinese breast cancer. *The Breast*, v. 23, n. 1, p. 88-93, 2014.

5. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. R. C., PEDROSA, N. L., LEITE, J. B. et al. Marcadores Tumorais: Revisão de literatura. *Rev. Bras. de Câncer*. 53 (3): 305-316, 2007.
- ALONZO, T.A. Standards for reporting prognostic tumor marker studies. *J Clin Oncol*. 23(36):9053-9054, 2005.
- ANDRIOLO, A. Marcadores tumorais bioquímicos circulantes. In: 1º Congresso Nacional de Saúde da Faculdade de Medicina da UFMG, 2008. Faculdade de Medicina da UFMG. Disponível em: <<http://www.ufmg.br/congressodesaude/>>. Acessado em: 20/06/2019.
- BALINT, E.; MANOLESCU, N.; BRASLASU, D. et al. Molecular detection through CEA (carcinoembryonic antigen) of different types of cancer in animal. *Lucrari Stiintifice Medicina Veterinara*. Timioara, v. 51, p. 89- 93, 2008.
- BICALHO, S. R. *Quantificação sérica do marcador tumoral CA 15.3 em cadelas hípidas por quimioluminescência*. 2012. 28 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal.
- CAMPOS, L. C.; LAVALLE, G. E.; ESTRELA-LIMA, A. et al. CA15.3, CEA, and LDH in dogs with malignant mammary tumors. *J Vet Int Med*. 26:1383–8, 2012.
- CAPELOZZI, V. L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. *J Pneumol*. 27 (6): 321- 28, 2001.
- CASSALI, G.D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E. et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors – 2013. *Braz J Vet Pathol*. 7 (2): 38 – 69, 2014.
- CHEUNG, K. L.; GRAVES, C. R. L.; ROBERTSON, J. F. R. Tumour marker measurements in the diagnostics and monitoring of breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*. v. 26, p. 91- 102, 2000.
- DE NARDI, A, B.; DALECK, C. R.; LAUFER-AMORIM, R. et al. Correlação da cicloxigenase-2 com o prognóstico dos carcinomas mamários de cadelas. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, n.27, p.619, 2007.
- ENGLAND, G.C.W. Pharmacologic control of reproduction in the dog and bitch. In: SIMPSON, G.; ENGLAND, G.; HARVEY, M. Manual of small animal reproduction and neomatology. London, BSA, p. 117-122, 1998.

FELICIANO, M. A. R.; JOAO, C. F.; CARDILLI, D. J. et al. Neoplasia mamária em cadelas – revisão de literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*. Ano IX. n. 18, 2012.

FLETCHER, R. H. Carcinoembryonic antigen. *Ann Intern Med*. 104:66-73, 1986.

FONSECA, C. S. & DALECK, C. R. Neoplasias mamarias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. *Ciência Rural*. 30 (4): 731-735, 2000.

FOSSUM, T. W., HEDLUND, C. S., HULSE, D. A. et al. Cirurgia de Pequenos Animais. 2ª ed. p. 1390. Roca, São Paulo, 2008.

GARRIDO, E. *Determinação dos valores plasmáticos de osteopontina em cães com tumores mamários metastáticos ou não. Correlações clínicas e anatomopatológicas*. 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal.

GOBELLO, C.; CONCANNON, P. W.; VERSTEGEN, J. P. Canine pseudopregnancy: a review. In: Concannon, P.W.; England, G.; Verstegen, J.; Linde-Forsberg, C. (Ed.) *Recent advances in small animal reproduction*. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2001.

GOLDMAN, L. C.; AUSIELLO, D. Tratado de medicina interna. In: Cooper DL. *Marcadores tumorais*. v. 2. 22ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; p.1309-312, 2005.

GRAHAM, J. C.; MYERS, R. K. The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 13, p. 416-418, 1999.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Reprodução animal. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004.

HARRIS L.; FRITSCHE H.; MENNEL R. American Society of Clinical Oncology 2007: Update of recommendations for the use tumor markers in breast cancer. *Journal Clinical Oncology*, v. 25, p.5287–5312, 2007.

JACOBS, E. L.; HASKELL, M. C. Clinical use of tumor markers in oncology. *Current Problems in Cancer*. Chicago, v. 15, n. 6, p. 299-360, 1991.

JOHNSTON, S. D.; ROOT-KUSTRITZ, M. R.; OLSON, P. N. S. Canine and feline theriogenology. Philadelphia: WB Saunders, 2001.

KLEIN, B. G. Cunningham tratado de fisiologia veterinária. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

- KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, A. D., Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. *Research in Veterinary Science*, v. 87, p. 91-96, 2009.
- MAGRO, A.M.; BENTO, R.S. Marcadores tumorais. *Medicina Interna*. v. 4, n. 3, p. 189-196, 1997.
- MANUALI, E.; DE GIUSEPPE, A.; FELIZIANI, F. et al. CA 15-3 cell lines and tissue expression in canine mammary cancer and the correlation between serum levels and tumour histological grade. *BMC Vet Res*, p. 8-86, 2012.
- MARCHESI, M.; CONTI, M.B.; PIERAMATI, C.; MANGILI, V.; FRUGANTIET, V. 54 Assessment and behavior of alphafetoprotein (AFP), antigen cancer 15/3 (CA 15/3), carcinoembryonal antigen (CEA) in clinical oncology of the dog: preliminary study. *Veterinary Research Communication*. v. 31 Suppl 1, p. 301-4, Aug 2007.
- MARCHESI, M. C.; MANUALI, E.; PACIFICO, E. et al. Cancer antigen 15/3: possible diagnostic use in veterinary clinical oncology. Preliminary study. *Veterinary Research Communication*, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. S103-S106, 2010.
- MARIE, P.; OZRETIE, P.; LEVANAT, S. et al. Tumor Markers in Breast Cancer - evaluation of their clinical usefulness. *Coll. Antropol.* 35 (1): 241-247, 2011.
- MARTINS, L. R.; LOPES, M. D. Pseudociese canina. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.29, n.3/4, p.137-141, jul/dez. 2005.
- MATTOS, L.L.; MACHADO, L.N.; SUGUIYAMA, M.M. et al. Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais. *Arq méd ABC*. 30(1):19-25, 2005.
- MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E. et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. 2nd series. v. VII. Washington DC, Arm. Forc. Inst. Pathol. American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology. p. 1-59, 1999.
- MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: D. J. Meuten (Ed.), *Tumors in domestic animals* (4th ed., p. 575-606). Iowa: Blackwell Publishing. 2002.
- MOLINA, R. et al. Tumor markers in breast cancer - European Group on Tumor Markers recommendations. *Tumour Biology*, v. 26, n. 6, p. 281-93, 2005 Nov/Dec 2005.
- NAZARIO, A. C. P.; ARAUJO NETO, J. T. Alterações funcionais benignas da mama. In: Baracat EC, Lima GR. *Guia de ginecologia*. São Paulo: Manole; p. 629-33, 2005.

NICOLINI, A.; TARTARELLI, G.; CARPI, A. et al. Intensive post-operative follow-up of breast cancer patients with tumour markers: CEA, TPA or CA15.3 vs MCA and MCA-CA15.3 vs CEA-TPA-CA15.3 panel in the early detection of distant metastases. *BMC Cancer*. v. 6, p. 269, 2006.

O'KEEFE, D. A. Tumores do sistema genital e das glândulas mamárias. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. (Eds). *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. 4 ed. São Paulo: Manole, p. 2344-2354. 1997.

OLIVEIRA, L. O., OLIVEIRA, R. T., LORETTI, A. P. et al. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Sci Vet*. 31(2): 105 – 110, 2003.

PARK, B.W; OH. J. W.; KIM, J. H. et al. Preoperative Ca15-3 and CEA serum levels as predictor for breast cancer outcomes. *Journal of Oncology*. Oxford, v. 19, n. 4, p. 675-681, April, 2008.

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

PELETEIRO, M. C.; MARCOS, R.; SANTO, M. et al. Glândula mamária. In: M. C. Peleteiro & T. Carvalho (Eds.), *Atlas de Citologia Veterinária* (1ª 77 Ed., pp. 215–231). Lisboa: Lidel, 2011.

PINTO, R. M. M. O. *Neoplasias Mamárias em Cadelas e Gatas*. 2009. 90f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

REECE, W. O. (Edt.). *Dukes fisiologia dos animais domésticos*. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

RIBAS, C. R., PETERSOM, T. D., FARIA, M. R. et al. Alterações clínicas relevantes em cadelas com neoplasias mamárias estadiadas. *Archives of Veterinary Science*. v. 17, n.1, p.60-68, 2012.

RIBEIRO, L.G.R. *Carcinoma inflamatório de mama em cadela: caracterização da resposta inflamatória, achados clínicos e anatomohistopatológicos*. 2012. 142f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA.

ROBERTO, G. B., ZILIOOTTO, L., SEKI, M. C. Avaliação comparativa de dosagem do marcador tumoral CA 15-3 em cadelas (*Canis lupus familiaris*) hígidas e com neoplasia mamária. *Pesq. Vet. Bras*. 38(9):1800-1807, setembro/2018.

RODASKI, S.; PIEKARS, C.H. Biologia do Câncer. In: DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B.; RODASKI, S. (Eds). Oncologia em cães e gatos. São Paulo: Roca, 2009. cap. 2, p 24 – 49. ISBN – 978-85-7241-764-8.

SENHORELLO, I. L. S. *Valor clínico do CEA e da AFP na detecção de carcinoma de mama em cadelas*. 2017. 32f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal.

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

SILVA, J. R. S. *Mastectomia em Cadelas - Variações da Técnica Segundo a drenagem Linfática da Cadeia Mamária - Revisão de Literatura*. 2006. 45f. Monografia (Pós-Graduação “Latu-sensu” em Clínica Cirúrgica em Pequenos Animais) – Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro.

SILVEIRA, A.S. Câncer ginecológico: Diagnóstico e tratamento. In: Gil RA. Fatores prognósticos, preditivos e marcadores tumorais no câncer ginecológico. Florianópolis: UFSC; 135-52, 2005.

SORENMO, K.U et al. Tumors of the Mammary Gland. In: Withrow, S.J. & Macewen, E.G. *Small Animal Clinical Oncology*. 5th ed. St Louis: Elsevier, 2013. cap. 27, p. 538 – 556.

SOUZA, J. V. Marker mucinous cancer associated. *Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, v. 46, n. 1,2, p. 70- 83, Jan/Jun 2002.

VALENCAKOVA-AGYAGOSOVA, A. et al. Determination of carcinoembryonic antigen and cancer antigen (CA 15-3) in bitches with tumours on mammary gland: preliminary report. *Veterinary and comparative oncology*, v. 12, n. 3, p. 205-214, 2012.

VERONESI, U.; LUINI A.; COSTA, A.; ANDREOLI, C. *Mastologia oncológica*. Milão: Medsi; 2002.

VON KLEIST, S.; MIGULE, I.; HALLA, B. Possible function of CEA as cell-contact inhibitory molecule. *Anticancer Res*. **15**: 1889– 1894, 1995.

WANG, G.; QIN, Y.; ZHANG, J. et al. Nipple discharge of CA15-3, CA125, CEA and TSGF as a new biomarker panel for breast cancer. *International journal of molecular sciences*, v. 15, n. 6, p. 9546-9565, 2014.

WU, S. G.; HE, Z. Y.; ZHOU, J. et al. Serum levels of CEA and CA15-3 in different molecular subtypes and prognostic value in Chinese breast cancer. *The Breast*, v. 23, n. 1, p. 88-93, 2014.

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

6. ANEXOS

Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido



Universidade Estadual do Centro-Oeste

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização de coleta de sangue para dosagem de marcador tumoral CEA referente ao projeto de pesquisa intitulado “Avaliação comparativa da dosagem do marcador tumoral CEA em cadelas (*Canis lupus familiaris*) hípidas e com doenças mamárias”, de responsabilidade da aluna de pós-graduação Alice Regina Machado Rabbers e da Prof^a Dr^a Liane Ziliotto. Estou ciente também que este procedimento não causa nenhum dano ao animal, por se tratar de um procedimento minimamente invasivo. Também me foi explicado que nenhum custo a mais será cobrado pelo exame.

Nome do Animal: _____ RG: _____

Nome do Responsável: _____

RG: _____ CPF: _____

Guarapuava, _____ de _____ de _____

Assinatura