



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

QUANTIFICAÇÃO DOS VALORES DA PRESSÃO PARCIAL DE OXIGÉNIO ( $PO_2$ ) E DA SATURAÇÃO DO OXIGÉNIO ( $SO_2$ ) PARA CARACTERIZAÇÃO DOS NÍVEIS DE HIPOXIA NO DÉBITO SANGUÍNEO DO TUMOR MAMÁRIO DE CADELAS – ESTUDO PRELIMINAR

SARA LUISA CASTRO SOBRAL LOPES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria da Conceição da Cunha  
e Vasconcelos Peleteiro

Doutor António José de Freitas Duarte

Doutor Luis Miguel Alves Carreira

ORIENTADOR

Doutor Luis Miguel Alves Carreira

2017

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

QUANTIFICAÇÃO DOS VALORES DA PRESSÃO PARCIAL DE OXIGÉNIO ( $PO_2$ ) E DA SATURAÇÃO DO OXIGÉNIO ( $SO_2$ ) PARA CARACTERIZAÇÃO DOS NÍVEIS DE HIPOXIA NO DÉBITO SANGUÍNEO DO TUMOR MAMÁRIO DE CADELAS – ESTUDO PRELIMINAR

SARA LUISA CASTRO SOBRAL LOPES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria da Conceição da Cunha

e Vasconcelos Peleteiro

Doutor António José de Freitas Duarte

Doutor Luís Miguel Alves Carreira

ORIENTADOR

Doutor Luís Miguel Alves Carreira

2017

LISBOA

---

Aos meus pais,  
por tudo o que sempre fizeram por mim



## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço à minha família, pois são e sempre foram o meu pilar, em especial à minha mãe, o meu modelo de pessoa. Obrigada por estares sempre por perto, pelo apoio mesmo nos momentos de devaneios, por acreditares em mim, por largares tudo para me ajudar, pelas conversas, pelo carinho, pelo exemplo e pelos valores que me transmitiste. Que esteja sempre à altura de te dar tudo o que já me deste, que não te desiluda e que seja um dos motivos que te fazem sorrir.

Ao meu pai, um homem de poucas palavras, mas de grandes sentimentos, pelos ensinamentos e valores transmitidos, por acreditar em mim, pelo incentivo e apoio incondicional que sempre me deu enquanto esteve presente.

À minha irmã pela sua paciência, pela generosidade, pela amizade e cumplicidade ao longo da minha vida. Aos meus sobrinhos pelos abraços apertados, pela ternura, pela alegria e inocência com que encaram a vida e me fazem sorrir.

Ao meu namorado e companheiro por mesmo quando está longe, estar sempre presente na minha vida, pelo apoio, pelo companheirismo, pela amizade, por me tentar fazer rir mesmo quando só me apetece chorar e por me fazer feliz.

Ao Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis, manifesto a minha gratidão pela disponibilidade e cooperação, pela informação partilhada e por todo o apoio na execução do trabalho exposto. Em particular ao Professor Miguel Carreira, não só como representante do CMVAA, mas também como meu orientador. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos transmitidos, motivação e preciosa ajuda ao longo de todo o meu percurso.

Ao Professor Doutor António Ferreira, Diretor clínico do Hospital Escolar da FMV, não só pela permissão de estágio concedida, mas também por toda a sua disponibilidade e ensinamentos transmitidos.

Obrigada ao Professor Telmo Nunes pela disponibilidade, pela boa disposição constante, pela paciência, por se preocupar e estar sempre pronto a ajudar.

Ao Dr. Rodrigo Bom agradeço pela alegria e boa disposição, pelos abraços, pelas palavras amigas, pela preocupação e apoio nos momentos mais difíceis. À Dra. Leonor Iglésias pelos ensinamentos. A ambos, obrigada por toda a ajuda e paciência na recolha do material de estudo dos casos.

Obrigada ao Dr. Gonçalo Vicente, à Dra. Joana Gomes, à Dra. Joana Pontes, à Dra. Ana Filipe, à Dra. Carla Monteiro, à Dra. Alexandra Basso, à Dra. Ana Reisinho, à Dra. Mariana Pereira, à Dra. Catarina Vieira, ao Dr. Oscar Gamboa, à Professora Sandra Jesus, pelos ensinamentos, pelo apoio, pela simpatia, pelos bons momentos partilhados, pela dedicação e amor aos animais.

À Sandra, ao Pedro, ao Filipe, ao Luís, à Joana, à Sofia, à Rita, à Raquel, à Margarida, à Carla Silva, à Carla Pardal e à Patrícia, pela disponibilidade, pela paciência, pela amizade e ajuda constante. Ao Sr. Álvaro pelo carinho permanente, pelo otimismo, por estar sempre disponível e por ser uma excelente pessoa. A todos os elementos do HE-FMV pela simpatia e disponibilidade.

Aos meus colegas de estágio, pelos sorrisos, pelas conversas, pelos momentos de cansaço partilhados, por todos os episódios que ficarão para sempre na minha memória. Um obrigada especial à Joana Dias e ao João Rosário que embora tenham entrado tarde na minha vida, rapidamente se tornaram no tipo de amigos que ficam para a vida e espero que permaneçam perto, mesmo quando estiverem longe. Obrigada Joana por me fazeres sempre rir, pelo teu feitio único e tão especial, por seres a excelente pessoa que és, pelas conversas, por todos os momentos de ajuda mental e sobretudo pela amizade e apoio constante, nunca mudes. Ao João pelo gosto mútuo pela cirurgia, pela amizade e por todo o apoio.

Aos amigos que fiz durante o curso. Ao João Assoreira, pelo companheirismo, por todos os bons momentos partilhados, pela descontração e pela boa disposição, pela maneira própria de ser e pela amizade que sei que perdurará. Ao Francisco pelos seus valores, por estar sempre disponível para ajudar, pela honestidade e por ser alguém a quem chamo de amigo. Ao Diogo pelos momentos de boa disposição e pela amizade.

À Susana que me acompanha desde o primeiro ano, minha colega de estágio e de dissertação, por tudo o que passámos, por termos partilhado mais uma etapa, por seres a minha “siamesa”, por estares sempre lá, por todas as conversas com ou sem sentido, por todos os momentos de ansiedade e desespero partilhados, pelas confidências, pelo apoio constante e amizade inabalável.

À Mónica por ser a pessoa extraordinária que é, pelo orgulho em ser sua amiga, por me ouvir sempre, pelos conselhos sábios, pelo carinho, pela sensatez, por estar sempre presente, por ser a minha “alma gémea”, por ser um pilar e uma das mulheres mais fortes, inteligentes e bonitas que conheço.

Tenho a sorte de ter como amigos, as melhores pessoas que existem neste mundo. E, mesmo sabendo que a rotina nos impedirá de comunicar diariamente, sei que passe o tempo que passar, o sentimento continuará o mesmo.

# QUANTIFICAÇÃO DOS VALORES DA PRESSÃO PARCIAL DE OXIGÉNIO (PO<sub>2</sub>) E DA SATURAÇÃO DO OXIGÉNIO (SO<sub>2</sub>) PARA CARACTERIZAÇÃO DOS NÍVEIS DE HIPOXIA NO DÉBITO SANGUÍNEO DO TUMOR MAMÁRIO DE CADELAS – ESTUDO PRELIMINAR

## RESUMO

Os tumores da mama representam a neoplasia mais frequente na cadela, com uma taxa de malignidade de cerca de 50%. A elevada taxa de proliferação celular verificada no desenvolvimento tumoral, resulta num inadequado aporte de oxigénio a algumas regiões do tumor originando zonas de hipoxia, a qual se relaciona num sistema causa-efeito com o nível de resposta terapêutica dos doentes oncológicos. O estudo presente foi realizado numa amostra de 32 indivíduos (N=32), da espécie *Canis familiaris*, do género feminino, e teve como objectivo quantificar o valor da pressão parcial de Oxigénio (PO<sub>2</sub>) e de saturação do Oxigénio (SO<sub>2</sub>) no débito sanguíneo do tumor mamário de cadelas. A amostra foi dividida em 2 grupos: 1) um grupo controlo (GC), formado por indivíduos saudáveis sujeitos a ovariectomia eletiva, e 2) um grupo estudo (GM), formado por cadelas com tumor mamário e submetidas a mastectomia. Cada indivíduo foi sujeito a duas colheitas de sangue, por punção nas veias epigástrica superficial caudal da mama e veia safena. A quantificação da PO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub> foi realizada utilizando o aparelho i-Stat, com o sistema analítico CG4+. A média de PO<sub>2</sub> na veia epigástrica caudal foi de 130,1±51,7 mmHg no GC e 166,5±49,9 mmHg no GM, e de 125,2±45,4 no GC e 122,9±60,1 no GM para a PO<sub>2</sub> na veia safena. Para a SO<sub>2</sub> a média foi de 97,6±3,3% no GC e 94,7±7,6% no GM, na veia safena, e de 97,92±3,5% para o GC e de 92,9±8,4% no GM na veia epigástrica caudal. Consideraram-se os resultados estatisticamente significativos para valores de  $p < 0,05$ . Não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre PO<sub>2</sub> de GC e GM ( $p > 0,05$ ) assim como entre a SO<sub>2</sub> de ambos os grupos ( $p > 0,05$ ). A dimensão da amostra, e a impossibilidade de medição da PO<sub>2</sub> e da SO<sub>2</sub> por método de medição intra-tumoral, poderão ter sido os principais factores que influenciaram os resultados obtidos.

**Palavras-chave:** Cão; Mastectomia; Pressão Parcial Oxigénio; Hipóxia.



## QUANTIFICATION OF THE PARTIAL OXYGEN PRESSURE (PO<sub>2</sub>) AND OXYGEN SATURATION (SO<sub>2</sub>) VALUES FOR THE CHARACTERIZATION OF HYPOXIA IN THE BLOOD FLOW OF MAMMARY TUMOR OF BITCHES - PRELIMINARY STUDY

### ABSTRACT

Mammary tumors represent the most common neoplasia in the bitch, with a malignancy rate of about 50%. The high rate of cell proliferation observed in tumor development results in an inadequate supply of oxygen to some regions of the tumor leading to areas of hypoxia, which is related to a cause-effect system with the level of therapeutic response of cancer patients. The present study was carried out on a sample of 32 individuals (N = 32), of the *Canis familiaris* species of the female genus, and had as objective to quantify the oxygen partial pressure (PO<sub>2</sub>) and oxygen saturation (SO<sub>2</sub>) in the blood flow of mammary tumor of bitches. The sample was divided into 2 groups: 1) a control group (CG), formed by healthy individuals subject to elective ovariohysterectomy, and 2) a study group (GM), formed by patients with mammary tumor and submitted to mastectomy. Each individual was subjected to two blood collections by puncture in the caudal superficial epigastric veins and saphenous vein. The quantification of PO<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub> was performed using the i-Stat apparatus with the CG4 + analytical system. The mean PO<sub>2</sub> in the caudal epigastric vein was 130.1 ± 51.7 mmHg in the CG and 166.5 ± 49.9 mmHg in the GM, and 125.2 ± 45.4 in the GC and 122.9 ± 60, 1 in GM for PO<sub>2</sub> in the saphenous vein. For SO<sub>2</sub> the mean was 97.6 ± 3.3% for GC and 94.7 ± 7.6% for GM, saphenous vein, and 97.92 ± 3.5% for GC and 92, 9 ± 8.4% in GM in the caudal epigastric vein. The results were statistically significant for p values <0.05. There were no statistically significant differences between PO<sub>2</sub> of GC and GM (p> 0.05) as well as between SO<sub>2</sub> of both groups (p> 0.05). The size of the sample and the impossibility of measuring PO<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub> by intra-tumor measurement method may have been the main factors that influenced the results obtained.

**Keywords:** Dog; Mastectomy; Partial Pressure Oxygen; Oxygen Saturation; Hypoxia



## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO.....	1
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO .....	4
CAPÍTULO II-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
1. BIOLOGIA DAS NEOPLASIAS .....	5
1.1 Ciclo celular.....	5
1.2 A carcinogénese: etiologia, as alterações genómicas e os oncogenes.....	6
2. A GLÂNDULA MAMÁRIA .....	9
2.1. Embriologia, Anatomia e Fisiologia .....	9
3. A ONCOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA .....	12
3.1. Epidemiologia dos tumores mamários .....	12
3.2. Etiologia do tumor de mama .....	14
3.2.1. Factores genéticos - Anomalias no ADN.....	14
3.2.2. Factores hormonais .....	16
3.2.3. Outros factores .....	17
4. DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO TUMOR DE MAMA.....	18
4.1. Classificação e estadiamento histopatológico.....	18
4.2. O estadiamento clínico e o sistema TNM .....	20
5. TERAPÊUTICA DO TUMOR MAMÁRIO .....	21
6. Prognóstico.....	23
7. Classificação molecular dos tumores mamários .....	24
8. O oxigénio tecidual.....	28
8.1. O oxigénio no tecido saudável .....	28
9. Hipóxia: métodos de deteção e o seu papel no desenvolvimento tumoral .....	31
9.1. Métodos directos .....	31
9.2. Métodos indirectos.....	32
10. Método para valoração PO <sub>2</sub> e SO <sub>2</sub> .....	34
CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	36
1. Objectivo do estudo .....	36

2. Materiais e Métodos.....	36
CAPÍTULO IV – RESULTADOS .....	39
CAPÍTULO V – DISCUSSÃO DE RESULTADOS .....	45
CAPÍTULO VI- CONCLUSÃO.....	50
CAPITULO VII – BIBLIOGRAFIA.....	51
ANEXOS .....	57
Anexo I.....	57
Anexo II- .....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Hipospadia em canídeo.....	2
<b>Figura 2-</b> Cirurgia plástica de reconstrução nasal após extirpação de carcinoma espinocelular nasal em felídeo.....	3
<b>Figura 3-</b> Pericardiectomia em canídeo .....	3
<b>Figura 4-</b> Ciclo Celular (Adaptado de Alberts, 2008) .....	5
<b>Figura 5-</b> Numeração das glândulas mamárias e respetiva drenagem linfática (Adaptado de Rodriguez, 2016) .....	10
<b>Figura 6-</b> Corte transversal de um tumor sólido ( adaptado de Oliveira & Ricardo, 2002) ....	30
<b>Figura 7-</b> Boxplot das dimensões do eixo maior dos tumores mamários .....	42
<b>Figura 8-</b> <i>Boxplots</i> dos valores da variável $PO_2$ e $SO_2$ obtidos por colheita de sangue da veia epigástrica, nos dois grupos de estudo .....	43
<b>Figura 9-</b> <i>Boxplots</i> dos valores da variável $PO_2$ , obtidos por colheita se sangue da veia safena e da veia epigástrica caudal da mama, no grupo GC .....	43
<b>Figura 10-</b> <i>Boxplots</i> dos valores da variável $PO_2$ , obtidos por colheita se sangue da veia safena e da veia epigástrica caudal da mama, no grupo GM .....	43
<b>Figura 11-</b> <i>Boxplots</i> dos valores da variável $SO_2$ , obtidos por colheita se sangue da veia safena e da veia epigástrica caudal da mama, no grupo GC .....	44
<b>Figura 12-</b> <i>Boxplot</i> dos valores da variável $SO_2$ , obtidos por colheita se sangue da veia epigástrica caudal da mama, no grupo GM .....	44

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-</b> Caracterização da amostra por grupos.....	39
<b>Gráfico 2-</b> Caracterização da amostra por raças.....	39
<b>Gráfico 3-</b> Distribuição das cadelas do grupo GM de acordo com o procedimento cirúrgico realizado .....	40
<b>Gráfico 4-</b> Classificação histopatológica dos tumores mamários presentes no grupo GM e respetivas frequências .....	41
<b>Gráfico 5-</b> Frequência relativa à localização dos tumores mamários.....	41

## ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1-</b> Classificação TNM dos tumores mamários em canídeos (adaptado de Sorenmo et al. 2012 e de Peleteiro & Correia,1993 ) .....	20
<b>Tabela 2-</b> Estadiamento dos tumores mamários de canídeos (adaptado de Sorenmo et al.2012).....	20
<b>Tabela 3-</b> Parâmetros avaliados pelo CG4+ e respectivos valores referência para sangue venoso (adaptado de Abbott, i-stat produtos,2016 e Waddel,2012) .....	37
<b>Tabela 4-</b> Tipos histopatológicos de tumor e respectivas frequências .....	40
<b>Tabela 5-</b> Características amostrais das variáveis PO <sub>2</sub> e SO <sub>2</sub> dos grupos GC e GM.....	42
<b>Tabela 6-</b> Frequências relativas (%) referentes aos casos clínicos acompanhados no HE-FMV, nas áreas de Medicina Preventiva, Patologia Cirúrgica e Patologia Médica.....	61
<b>Tabela 7-</b> Frequências relativas (%) referentes aos casos clínicos acompanhados no HE-FMV, na área de Medicina Preventiva.....	61
<b>Tabela 8-</b> Frequências relativas (%) referentes aos casos clínicos acompanhados no HE-FMV, na área de Patologia Cirúrgica.....	61
<b>Tabela 9-</b> Frequências relativas (%) referentes aos casos clínicos acompanhados no HE-FMV, nas várias áreas de Patologia Médica.....	61
<b>Tabela 10-</b> Frequências relativas (%) referentes aos casos clínicos acompanhados na HE-FMV, nas áreas de Imagiologia.....	62
<b>Quadro 1-</b> Classificação e breve caracterização histológica de tumores mamários malignos da espécie canina (adaptado de Misdorp et al. 1999).....	57
<b>Quadro 2-</b> Classificação e breve caracterização histológica de tumores mamários benignos da espécie canina (adaptado de Misdorp et al. 1999).....	59
<b>Quadro 3-</b> Classificação de lesões não neoplásicas da espécie canina (adaptado de Misdorp et al. 1999).....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ADN-** Ácido desoxirribonucleico

**ADP** - Poli-adenosina difosfato

**ARN-** Ácido ribonucleic

**Bcl-2** - proteína linfoma de células B 2

**BRCA1** – *Breast Cancer type 1 susceptibility protein*

**BRCA2** – *Breast Cancer type 2 susceptibility protein*

**CEBEA-** Comissão de Ética e Bem-estar Animal

**CK** - Citoqueratinas

**CMVAA-** Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis

**CO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono

**COX-2-** Enzima Cicloxigenase-2

**EGFR** - Recetor do fator de crescimento epidérmico

**EGFR<sup>+</sup>** - Recetor do fator de crescimento epidérmico positivo

**GADD45-** *Growth Arrest and DNA Damage 45*

**GC** - Grupo de controlo

**GM-** Grupo de estudo

**HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>** Bicarbonato

**HER2-** Receptor do Factor de Crescimento Humano Tipo 2

**HIF-1** - Factor alfa-1 induzido pela hipóxia

**HIF-2** - Factor alfa-2 induzido pela hipóxia

**HE-FMV-** Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa

**IM-** Via de administração intramuscular

**IV-** Via de administração intravenosa

**O<sub>2</sub>-** Oxigénio

**OVH-** Ovariohisterectomia

**PCO<sub>2</sub>** - Pressão parcial de dióxido de carbono

**PO<sub>2</sub>** - Pressão parcial de oxigénio

**pH-** Potencial de hidrogénio iónico

**pKa-** Valor negativo do logaritmo da constante de dissociação de um ácido

**p21-** Proteína 21

**p53**- Proteína 53

**RE** - Recetores de estrogénios

**RE<sup>-</sup>** - RE negativo

**RP** - Recetores de progesterona

**RP<sup>-</sup>** - RP negativo

**SC**- Via de administração subcutânea

**SO<sub>2</sub>** - Percentagem de hemoglobina saturada com oxigénio

**TC**- Tomografia computadorizada

**TGF- $\alpha$** - Fator de crescimento transformante alfa

**TNM** -Tumor-linfonodo-Metástase (Sistema de classificação TNM)

## ÍNDICE DE SÍMBOLOS

$\bar{x}$  Média

$\sigma$  Desvio Padrão

% Percentagem

= Igual

< Inferior

> Superior

°C Graus Celsius

cm Centímetro

g/dL Gramas por decilitro

kg Quilograma (unidade de peso)

L Litro (unidade de volume)

mg Miligrama (unidade de medida)

mg/dL Miligramas por decilitro

ml Mililitro (unidade de medida)

ml/h Mililitro por hora

mm Milímetro

mmHg Milímetros de mercúrio (unidade de pressão)

mmol/L Milimoles por litro

vs Versus



## **ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO**

---

O presente relatório foi elaborado no seguimento do estágio final do curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, com o objectivo de apresentar as actividades desenvolvidas durante esse período.

O estágio curricular, sob a orientação do Professor Miguel Carreira, teve lugar no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (HE-FMV), durante um período de 7 meses (Setembro de 2015 a Março de 2016), abrangendo as áreas de Medicina e Cirurgia de Animais de Companhia e Exóticos.

Os valores referentes à análise descritiva relativa à casuística acompanhada durante o período de estágio nas áreas acima referidas, encontra-se em anexo (Anexo II).

### **Atividades desenvolvidas na área clínica**

O estágio decorrido no HE-FMV, foi organizado em escalas mensais, de modo a ser possível contactar com as diferentes áreas clínicas, que incluíram a Medicina Interna (Patologia Médica e Medicina Preventiva), Cirurgia, Imagiologia e Internamento. Para além das áreas anteriormente referidas, também foram realizadas tarefas em áreas mais especializadas, nomeadamente em consultas de especialidade (animais exóticos, cardiologia, comportamento animal, dermatologia, endocrinologia, neurologia, oftalmologia, oncologia, ortopedia e traumatologia), na quimioterapia e no banco de sangue.

As escalas mensais eram organizadas em turnos rotativos de 8 horas que compreendiam o período da manhã (das 8 horas às 16 horas) ou o período da tarde (das 13 horas às 21 horas), excetuando os turnos de Internamento que tinham a duração de 12 horas. No final do estágio, a carga horária total realizada, excluindo tempo adicional não previsto na escala mensal, foi de 1270 horas.

Ao integrar a equipa de alunos estagiários do HE-FMV, tive a oportunidade de contar com o acompanhamento e supervisão de vários profissionais entre os quais, professores, médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares, durante a realização de todo o meu trabalho. O que me permitiu participar ativamente nos diversos serviços e conseqüentemente, alcançar uma maior consolidação dos conhecimentos teóricos.

A área de Medicina Interna, permitiu-me participar em consultas externas gerais, bem como em consultas de referência, nomeadamente na área de Cardiologia, Dermatologia, Oncologia, Oftalmologia, Medicina de animais exóticos, Neurologia, Ortopedia e Traumatologia. Nesta área, tinha como função iniciar e conduzir a consulta, bem como a realização da anamnese e exame físico geral e de especialidade. Posteriormente, apresentava os casos clínicos ao médico veterinário, discutindo-se em seguida o plano de

diagnóstico e a terapêutica a instituir. Aqui, foi possível desempenhar com relativa frequência vários procedimentos nomeadamente: vacinação, preparação e administração de fármacos por via parenteral, identificação eletrónica, colheitas de sangue para análises (o que engloba punção nas veias cefálica, jugular, safena e femoral), cateterizações periféricas, realização de microhematócritos, esfregaços sanguíneos, colheita e coloração de material obtido pelo método da zaragatoa (pavilhão auricular e canal auditivo externo), medições de glicémias, citologias cutâneas, teste de fluoresceína e limpeza de feridas. Com menor frequência, foi possível ainda realizar alguns procedimentos mais invasivos como drenagem de otohematomas, algaliação de machos, colocação de tubos esofágicos, realização de cistocentese e de pensos simples e ortopédicos (Robert-Jones). Durante as consultas externas tive a oportunidade de observar um caso de hipospádia (fotografia 1).

**Figura 1-** Hipospádia em canídeo



No âmbito da Cirurgia, tive como funções a recepção dos animais, esclarecimento ao proprietário dos cuidados a ter com o doente no período pré e pós-cirúrgico, bem como observação das respetivas análises pré-cirúrgicas, cateterização venosa do doente, entubação endotraqueal e preparação do campo operatório (tricotomia, limpeza e assépsia). Nesta área participei como anestesista (monitorização anestésica e dos sinais vitais do doente), circulante (preparação do paciente e da mesa cirúrgica) e ajudante de cirurgião, acompanhando igualmente todo o período pós-cirúrgico dos pacientes. Tive a oportunidade de por vezes realizar sob a supervisão do cirurgião, alguns procedimentos como suturas de pele, moldes dentários com alginato, destartarização, exérese de nódulos cutâneos e uma ovariohisterectomia (OVH) de gata. No período pós-cirúrgico, fui incentivada pelo orientador a estabelecer contacto via telefónica e esclarecimento dos proprietário relativamente à intervenção efectuada, bem como a prescrição da terapêutica pós-cirúrgica, sob a supervisão e a aprovação do orientador e posteriormente o seguimento pós cirúrgico. Tive ainda a oportunidade de observar a realização de alguns procedimentos cirúrgicos menos comuns como a cirurgia plástica de reconstrução nasal após extirpação de carcinoma espinocelular nasal (fotografia 2) e a pericardiectomia (fotografia 3).

**Figura 2-** Cirurgia plástica de reconstrução nasal após extirpação de carcinoma espinocelular nasal em felídeo



**Figura 3-** Pericardiectomia em canídeo



No serviço de imagiologia as rotações eram feitas por três áreas: radiologia, tomografia computadorizada (TC) e ecografia.

Quando estive na radiologia, tive a oportunidade de assistir à realização de estudos radiográficos simples e de contraste, trânsitos baritados e mielografias. Na TC, fui responsável por ajudar na indução da anestesia e monitorização da mesma durante o exame. Posteriormente, com o apoio dos médicos veterinários do serviço acompanhei a análise e interpretação dos resultados. Na ecografia, ajudei na preparação, posicionamento e contenção do doente. Acompanhei e participei em alguns procedimentos ecoguiados, como a colheita de urina por cistocentese e PAAF ósseas.

Os turnos no Internamento permitiram um maior acompanhamento dos casos clínicos, mas para isso foi necessário que houvesse uma boa gestão e organização do trabalho, de forma a conseguir realizar todas as tarefas necessárias que fazem parte da rotina diária deste serviço, mesmo em períodos com maior volume de trabalho. Aí com acompanhamento de enfermeiros, auxiliares e do médico veterinário, desempenhei vários procedimentos com objectivo de assegurar o bem-estar dos doentes, entre os quais: passeios frequentes, alimentação, monitorização, administração de medicação bem como outros procedimentos mais especializados em animais com necessidade especiais ou com limitações (como limpeza de feridas, algaliação, enemas, curvas de glicémias, fisioterapia, cuidados neonatais entre outros).

## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

---

Com o aumento da esperança média de vida dos animais, é previsível um aumento progressivo do número de casos tumorais. No caso concreto dos tumores mamários, estes representam um desafio tanto na área de clínica como na área de investigação pois, para além de serem as neoplasias com maior incidência em cadelas, são ainda patologias de etiologia multifatorial com vários fatores predisponentes (Morris & Dobson, 2001; Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012).

O estudo dos tumores mamários na cadela tem adquirido uma importância cada vez maior, não só pela elevada casuística na prática clínica mas também por partilharem várias características epidemiológicas, morfológicas, clinico-patológicas e bioquímicas com os tumores mamários em mulheres (Kumaraguruparan, Prathiba, & Nagini, 2006). Torna-se portanto essencial a deteção precoce das neoplasias antes da sua disseminação pelo organismo do animal, o que implica conhecimentos cada vez maiores e mais profundos sobre as características e comportamentos funcionais das lesões malignas. Saber apenas quais são as características morfológicas das lesões tumorais já não é suficiente, é importante conhecer e perceber o que se passa no micro ambiente tumoral. Uma característica tumoral que tem vindo a ser reconhecida como tendo elevada importância prognóstica é a hipóxia tumoral (Lapa, et al., 2015).

Para uma melhor compreensão dos tumores mamários é apresentada, em seguida, uma breve descrição sobre neoplasias e glândula mamária.

### 1. BIOLOGIA DAS NEOPLASIAS

#### 1.1 Ciclo celular

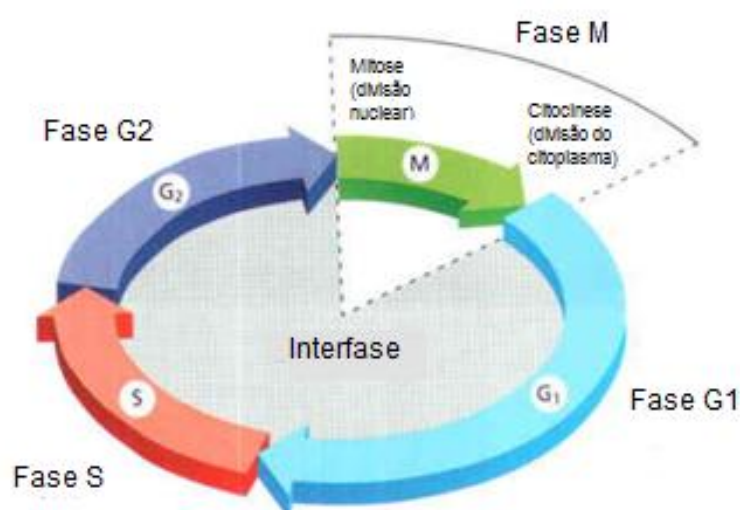
O ciclo celular divide-se em duas fases, a interfase e a fase mitótica (Figura 4) (Argyle & Khanna, 2013).

A interfase (fase na qual a célula se encontra a maior parte do tempo), corresponde ao período entre o final de uma divisão celular e o início da divisão seguinte, e é constituída por 3 fases: a fase G<sub>1</sub> (fase de crescimento, caracterizada pela síntese de proteínas, enzimas e ácido ribonucleico (ARN)), a fase S (fase de síntese do ácido desoxirribonucleico (ADN)) e pela fase G<sub>2</sub> (quando a célula se prepara para a divisão celular) (Argyle & Khanna, 2013).

A fase mitótica inclui duas etapas: a cariocinese (divisão do núcleo) e a citocinese (divisão do citoplasma) (Argyle & Khanna, 2013).

As células que não se encontram em proliferação são denominadas de células em fase G<sub>0</sub>, já que se encontram num estado quiescente entre a fase M (mitose) e a fase G<sub>1</sub> do ciclo celular. É nesta fase que se encontra a maioria das células dos tecidos normais, sendo posteriormente estimuladas a entrar no ciclo celular em resposta a factores externos como os factores de crescimento (Argyle & Khanna, 2013).

**Figura 4-** Ciclo Celular (Adaptado de Alberts, 2008)



## **1.2 A carcinogénese: etiologia, as alterações genómicas e os oncogenes**

A carcinogénese compreende 3 fases: a iniciação, a promoção e a progressão (Kusewitt & Rush, 2007). A iniciação é a altura em que a célula é exposta aos agentes carcinogénicos sofrendo conseqüentemente uma mutação, originando células atípicas. Estas células iniciadas podem parecer morfológicamente normais e permanecerem em repouso durante vários anos; contudo, as várias mutações que apresentam podem proporcionar-lhes vantagens no crescimento sob determinadas condições especiais. Por exemplo, podem responder mais vigorosamente a sinais mitogénicos, ou serem mais resistentes a estímulos indutores de apoptose.

Relativamente à segunda fase, a promoção, é onde ocorre o crescimento celular em resposta a determinados estímulos selectivos que promovem a proliferação celular e que são denominados de agentes promotores ou apenas de promotores. Em geral estes promotores não são mutagénicos, em vez disso, criam um ambiente em que as células iniciais têm uma maior facilidade de crescimento. Uma vez que os promotores não são mutagénicos, os seus efeitos são geralmente reversíveis.

Por fim, a fase da progressão caracteriza-se por envolver a conversão maligna das células, ou seja, as células transformadas já têm autonomia para proliferar, perdendo a coesão, tornando-se móveis e invasivas, podendo originar a ocorrência de doença metastática (Kusewitt & Rush, 2007; Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012).

O desenvolvimento tumoral é assim um processo que envolve a acumulação de mutações ao nível do ADN celular, levando a uma desregulação dos genes que controlam o crescimento e a diferenciação celular. Estes genes podem ser ativados, inativados ou ter o seu nível de expressão alterado. A transformação de uma célula normal em uma célula tumoral, exige múltiplas mutações, verificando-se uma progressão ordenada desde o estado inicial de lesão benigna até ao estado de lesão maligna, a qual pode posteriormente ser classificada histopatológicamente de acordo com o seu grau de gravidade (Morris & Dobson, 2001; Kusewitt & Rush, 2007). Embora as alterações genéticas possam ocorrer nas células germinativas e estarem assim presentes no corpo desde a altura do nascimento, o mais comum é ocorrerem ao longo da vida, dependentes em muitos casos do processo de envelhecimento e da sua acumulação ao longo do tempo (Morris & Dobson, 2001).

É durante as fases S e G2 que ocorrem a maioria dos erros genéticos, alterando assim o ADN das células. Com a idade as alterações ocorrem em maior número já que, escapam mais facilmente aos mecanismos de reparação do ADN. Estas alterações podem ser de 3

tipo: 1)mutação pontual, 2)deleção ou 3)amplificação, conduzindo a um aumento, diminuição ou mesmo ausência da expressão de proteínas normais, ou até mesmo à síntese de proteínas alteradas, como é o exemplo da proteína codificada pelo gene p53, que ao deixar de ser expressa ou ao ser sintetizada de forma errada, torna-se inactiva na supressão tumoral. Adicionalmente pode existir sobre-expressão de oncogenes codificadores de proteínas alteradas, as chamadas oncoproteínas (Kusewitt & Rush, 2007).

A mutação pontual consiste na perda ou substituição de uma base por outra na hélice de ADN. O que pode ou não ter efeitos na síntese proteica (Morris & Dobson, 2001).

Quanto à deleção, esta caracteriza-se pela perda de uma porção de pares de bases, alterando a proteína codificada por esse gene ou interrompendo mesmo a sua produção (Morris & Dobson, 2001). Por fim, na amplificação existe uma repetição de sequências do ADN o que pode aumentar o número de cópias do gene, não implicando contudo que haja um aumento do nível de expressão desse mesmo gene (Morris & Dobson, 2001).

As mutações espontâneas que podem ocorrer a nível dos cromossomas consistem em modificações na sua morfologia e/ou no seu número. A perda ou adição de sequências nos cromossomas vai alterar o conteúdo total de ADN, e consequentemente reduzir ou amplificar a expressão de determinados genes, já que o número de cópias desses genes irá variar (Morris & Dobson, 2001).

Apesar de todas as células do corpo conterem o mesmo ADN e portanto os mesmos genes, o número e tipo de genes ativos em cada uma das células diferem. Mesmo no que diz respeito a uma determinada célula, alguns genes são ativados em determinadas alturas da vida e inativados noutras. Estas alterações denominadas de alterações epigenéticas, consistem em modificações reversíveis do genoma de carácter hereditário, que não envolvem alterações na sequência de ADN e podem ser o resultado de 3 mecanismos principais: 1) a metilação do ADN, 2) as modificações de histonas e o 3) registo genómico (Argyle & Khanna, 2013).

Os oncogenes derivam dos chamados proto-oncogenes que estão presentes nas células normais. São genes promotores do crescimento e da diferenciação celular que controlam a divisão mitótica ordenada das células. Um proto-oncogene transforma-se num oncogene através de mecanismos como a amplificação, a translocação cromossomal, a mutação e até mesmo por meio das inserções virais, passando a estar continuamente ativo e deixando consequentemente de responder a sinais inibitórios. Quando isto acontece, o crescimento celular deixa de estar sob controlo, ocorrendo um crescimento descontrolado das células,

contribuindo para o desenvolvimento de um processo neoplásico (Kusewitt & Rush, 2007; Argyle & Khanna, 2013).

Os genes supressores tumorais são genes responsáveis por controlar a divisão celular, o processo de apoptose, e reparar as alterações que existam na sequência de ADN . Quando são desativados, a divisão celular torna-se descontrolada, permitindo assim o aparecimento de lesão neoplásica (Argyle & Khanna, 2013). Estes genes atuam de forma recessiva, ou seja é necessário que os dois alelos estejam afectados (inativos) para que o gene se encontre desativado. Assim se entende que, quando é herdada uma cópia alterada do gene (famílias predispostas) a idade em que surgem neoplasias é menor, pois ao nascerem estes indivíduos já têm pelo menos um dos alelos afetado, sendo que o outro poderá ser afetado por eventos espontâneos ao longo da vida, possibilitando assim a ocorrência de neoplasias mais precocemente. Em contrapartida se o individuo não nascer com um alelo afetado, terá que sofrer alterações nos dois alelos para que ocorra a inativação do gene supressor tumoral, o que exige maior intervalo de tempo (Morris & Dobson, 2001; Argyle & Khanna, 2013).

No entanto, alguns estudos realizados sugerem que para alguns destes genes supressores tumorais é suficiente que ocorra apenas a inativação de um dos alelos para que se processe o desenvolvimento neoplásico (Kusewitt & Rush, 2007).

Também é interessante referir o papel de algumas enzimas na carcinogénese da mama. É o caso da enzima cicloxigenase-2 (Cox-2) pertencente à família das enzimas ciclooxygenase que catalizam a conversão do ácido araquidónico em precursores das prostaglandinas e tromboxanos, essenciais para a manutenção da homeostasia do ciclo celular. Esta enzima está hoje em dia relacionada com o tipo histológico do tumor, encontrando-se com sobre-expressão em várias neoplasias mamárias da cadela. De um modo geral, quanto mais indiferenciado for o tumor e conseqüentemente maior a sua malignidade, maior será a expressão da Cox-2 (Klopfleisch & Gruber, 2009). Um estudo levado a cabo por Doré et al. (2003) constatou que a Cox-2 estava expressa em 24% dos adenomas e em 56% dos adenocarcinomas. Adicionalmente, Queiroga et al. (2007) demonstraram que numa glândula mamária normal a expressão da Cox-2 é muito reduzida ou mesmo nula. Em 2006, Millanta et al., constataram que 100% dos carcinomas mamários caninos expressavam Cox-2. Um outro estudo realizado por Queiroga et al. (2011), estabelece uma relação entre expressões elevadas de Cox-2 e o desenvolvimento de metástases à distância, a angiogénese e um pior prognóstico de doença.

## **2. A GLÂNDULA MAMÁRIA**

### **2.1. Embriologia, Anatomia e Fisiologia**

A glândula mamária é uma glândula apócrina modificada, que se desenvolve embriologicamente a partir de um espessamento bilateral da epiderme ventrolateral da parede abdominal, denominado de linhas mamária e que se estende desde a região axial até à região inguinal (Junqueira & Carneiro, 2008).

A maior parte da linha mamária involui pouco depois da sua formação, sendo o comprimento da porção remanescente variável com a espécie, dependendo do número de glândulas mamárias características de cada espécie. Posteriormente dá-se a condensação do mesênquima e o espessamento da epiderme sobrejacente em intervalos específicos ao longo da linha mamária. Este espessamento dá origem ao botão mamário primário, que irá penetrar no mesênquima subjacente formando botões mamários secundários os quais se alongam e ramificam para formar os alvéolos e os ductos mamários (Hyttel, Sinowatz, & Vejlested, 2010). A glândula mamária completamente desenvolvida é formada por um conjunto de lóbulos de glândulas túbulo-alveolares compostas, separados entre si por septos de tecido conjuntivo e por um abundante tecido adiposo. Cada lóbulo, como glândula individualizada que é, tem o seu próprio ducto excretor denominado de ducto galactóforo, o qual emerge de forma direta e independente no mamilo. Na cadela cada mamilo pode ter entre 15-25 dessas aberturas (Carneiro & Junqueira, 2008).

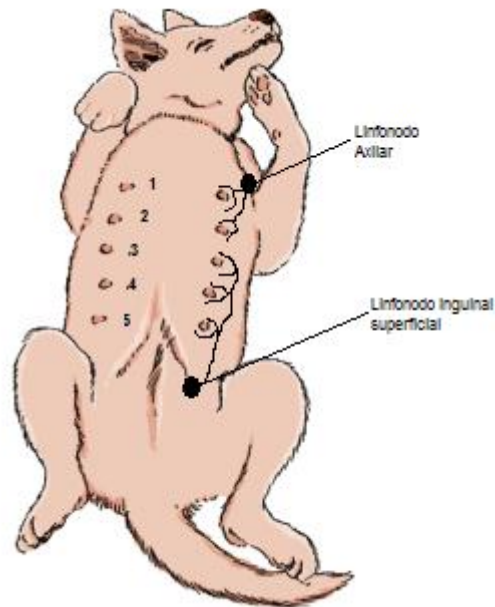
No caso da cadela, existem habitualmente 5 pares de glândulas mamárias dispostas de cada lado da linha média, embora seja relativamente frequente a existência de 6 pares, enquanto que a presença de 4 pares é pouco usual. Podem ainda existir casos de mamilos supranumerários isolados (Silver, 1966).

As glândulas são numeradas e denominadas segundo a sua localização anatómica em torácicas craneais (1) e caudais (2), abdominais craneais (3) e caudais (4) e inguinais (5) (Figura 5) (Peleteiro M. , 1994; Radostits, Mayhew, & Houston, 2002).

Na cadela o mamilo é constituído por uma quantidade relativamente grande de músculo liso disposto em duas camadas, uma interior circular e outra exterior longitudinal, o que a diferencia por exemplo da gata, em que o músculo liso está organizado em três camadas.

Os ductos galactóforos são revestidos por uma dupla camada de células epiteliais cúbicas ou cilíndricas baixas, e os ductos interlobulares são constituídos por epitélio simples cilíndrico, podendo ser cúbico no caso dos ductos intralobulares (Peleteiro M. , 1994).

**Figura 5-** Numeração das glândulas mamárias e respetiva drenagem linfática (Adaptado de Rodriguez, 2016)



O principal aporte arterial das glândulas mamárias vem das artérias epigástricas superficiais craneal e caudal. As glândulas torácicas recebem um aporte adicional dos ramos provenientes das artérias torácicas internas, ramos cutâneos das artérias intercostais caudais a T7, e das artérias torácicas laterais (Silver, 1966; Radostits et al., 2002) . As glândulas abdominais e inguinais obtêm um aporte vascular adicional dos vasos ilíacos circunflexos e segmentados, da artéria epigástrica caudal e dos ramos da artéria perineal e perivulvar. As duas artérias epigástricas anastomosam-se ao redor do umbigo e alguns vasos podem mesmo cruzar a linha média de uma glândula para o seu par (Silver, 1966; Radostits et al., 2002).

A vascularização venosa circula paralelamente à arterial, com exceção das veias superficiais que podem cruzam a linha média com mais frequência do que as artérias, o que em caso de neoplasia mamária facilita sempre a disseminação de células neoplásicas entre o mesmo par da glândula (Silver, 1966; Radostits et al., 2002).

A drenagem linfática das glândulas mamarias é levada a cabo pelos linfonodos axilares e inguinais, drenando as glândulas 1 e 2 para o linfonodo axilar, enquanto as 3,4 e 5 drenam para o linfonodo inguinal superficial (Radostits et al., 2002).

Quanto à inervação, as glândulas mamárias são ricamente inervadas pelos nervos cutâneos. As glândulas mamárias craneais são inervadas pelo 4º, 5º e 6º nervos cutâneos lateral e ventral provenientes do nervo intercostal, enquanto que as torácicas caudais recebem a sua inervação do 6º e 7º nervos cutâneos (Fossum et al., 2007).

As glândulas inguinais são inervadas pelo vasomotor e tanto as glândulas abdominais como as inguinais podem ainda receber fibras dos nervos que inervam o músculo recto abdominal. (Silver, 1966).

Estruturalmente a glândula mamária sofre alterações de acordo com o sexo, idade e estado fisiológico do indivíduo (Carneiro & Junqueira, 2008). Assim entre o nascimento e a puberdade a glândula mamária cresce isometricamente, ou seja, cresce à mesma velocidade que o indivíduo. Nesta fase a glândula mamária é composta principalmente por tecido adiposo e uma rede rudimentar e limitada de ductos epiteliais. Na puberdade, devido à influência das hormonas sexuais, em particular do estrogénio, ocorre um desenvolvimento dos canais mamários, do estroma e dos vasos sanguíneos, pelo que a glândula mamária cresce alométricamente, ou seja, a uma taxa mais rápida do que o resto do corpo (Hyttel et al., 2010).

No primeiro estro, a produção de estrogénio juntamente com a hormona de crescimento, conduz ao desenvolvimento de um sistema tubular, organizado em lobos e lóbulos, envolvidos por um denso estroma conjuntivo (Reece, Erickson, Goff, & Uemura, 2015).

Embora o início do desenvolvimento mamário ocorra com o início da puberdade, a glândula mamária permanece relativamente subdesenvolvida até à altura da gestação (G. Cunningham & G. Klein, 2007). No decurso desta, em particular durante o seu último terço, há um crescimento do parênquima mamário caracterizado por um extenso desenvolvimento lóbulo-alveolar. Nesta fase também ocorre o desenvolvimento glandular, com a proliferação das células epiteliais da porção terminal dos ductos intralobulares e a formação dos alvéolos secretores. A produção de progesterona e prolactina é indispensável para que ocorra o desenvolvimento destes alvéolos a partir das terminações dos ductos (G. Cunningham & G. Klein, 2007). Os alvéolos são formados por epitélio cilíndrico simples rodeado por células mioepiteliais, músculo liso e por uma extensa rede vascular e nervosa.

Durante a lactação, as células mioepiteliais sob a influência da hormona ocitocina participam no processo de expulsão do leite (Reece et al., 2015). Estas células respondem não só à ocitocina mas também ao seu próprio alongamento, pelo que quando se exercer força na mama cheia de leite, os elementos contráteis são subitamente estirados, levando a uma contracção dos mesmos. Este é um mecanismo de esvaziamento local e parece estar relacionado com os movimentos dos membros anteriores que os neonatos apresentam

aquando da amamentação. No Homem as células mioepiteliais podem ser a origem de algumas formas de tumores mamários malignos (Silver, 1966).

Também as hormonas tiroideias têm um papel importante no desenvolvimento da mama pois estão relacionadas com a taxa metabólica e com o consumo de oxigénio global pelo corpo (Reece et al., 2015).

Na altura do parto, verifica-se a existência de secreção láctea acumulada no lúmen dos alvéolos e uma diminuição substancial do estroma conjuntivo. Durante a lactação, os ductos e alvéolos apresentam-se bastante distendidos, e na cadela cerca de 10 dias após o parto os alvéolos começam a regredir sendo que passados 40 dias a maioria deles já foi reabsorvida permanecendo apenas os ductos, reduzindo-se assim o volume da mama (Silver, 1966).

### **3. A ONCOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA**

#### **3.1. Epidemiologia dos tumores mamários**

Os tumores da pele são os mais frequentes no cão, seguidos dos tumores mamários e, se apenas considerarmos o sexo feminino, o tumor da mama surge como o mais frequente, representando cerca de 70% de todos os tumores diagnosticados na cadela (Euler, 2011; Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012). Um estudo levado a cabo no Reino Unido demonstrou uma taxa anual de 205 tumores mamários em 100.000 animais (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012), o que está de acordo com a taxa de incidência anual anteriormente descrita no estudo de Misdorp (2002) que estabelecia uma relação de 198/100.000. De acordo com Cullen et al.,(2002) as cadelas são cerca de 4 vezes mais afectadas por tumores mamários do que as mulheres.

Mais recentemente, um estudo realizado por Salas et al., (2015) numa amostra de 1.917 biópsias de mama de canídeos ao longo de um período de 10 anos concluiu que, a taxa anual de tumores mamários é de 16,8%; e destes 47,7% são benignos e 47,5% são malignos. No entanto, as taxas de variação em gravidade e malignidade dos processos oncológicos da mama são altamente variáveis. Alguns autores defendem que o grau de malignidade na espécie canina varia de 36 a 91,4% (De Oliveira & R. T., 2003), enquanto outros afirmam que varia entre 41 a 53% (Andrade, Figueiroa, Bissacot, & Rocha, 2010)

Segundo Misdorp (2002), os tumores mais comuns na cadela são o Adenoma complexo e o Tumor benigno misto (fibroadenomas). Relativamente aos tumores malignos, existe uma maior prevalência dos carcinomas sólidos, seguidos pelos carcinomas tubulares e em menor

percentagem aparecem os sarcomas (3%) e os carcinomas inflamatórios (1%) (Chun & Garrett, 2010; Misdorp, 2002).

Está provado que a incidência de tumores mamários diminuí em fêmeas submetidas a ovariectomia precoce e aumenta nos animais sujeitos a terapias inibidoras do estro com progestagénios. Inclusivamente, o risco de desenvolvimento de tumores mamários é tanto maior quanto mais tarde for realizada a ovariectomia. Cadelas esterilizadas antes do primeiro estro apresentam um risco de desenvolvimento de tumores mamários malignos de 0,5%, o qual aumenta para 8% quando esterilizadas após o primeiro estro e para 26% quando esterilizadas após o seu segundo estro (Euler, 2011; Sorenmo et al., 2012; Henry, 2014). Em contrapartida o recurso à ovariectomia após o aparecimento e desenvolvimento do tumor mamário não tem qualquer efeito curativo (Alenza, Peña, Del Castillo, & Nieto, 2002).

As neoplasias mamárias são muito raras em animais jovens. A sua incidência tende a aumentar com a idade, sendo mais comuns em cadelas a partir dos 7 anos de idade, aumentando progressivamente até aos 11-13 anos. Sorenmo et al. (2012) e Euler (2011) realizaram um estudo na Suécia com uma população de 80.000 cadelas, demonstrando que o risco de desenvolvimento de neoplasia mamária aumenta à medida que a idade avança, cujos resultados relatam que em 6% de animais com 8 anos e 13% de animais com 10 anos, foi diagnosticado pelos menos um tumor mamário. A idade média para o aparecimento de tumores malignos situa-se entre os 9-11 anos, enquanto que para as displasias mamárias é mais frequente entre os 2-4 anos e para os tumores benignos entre 7-9 anos. As neoplasias mistas benignas aparecem cerca de 1-2 anos mais cedo do que os carcinomas (Villalobos & Kaplan, 2007).

A idade média para o aparecimento de cada tipo de tumores mamários está também relacionada com a esperança média de vida de cada raça. Em geral, animais de raças grandes têm uma esperança média de vida inferior aos animais de raças pequenas, pelo que tendem a ser diagnosticados com tumores mamários numa idade mais precoce (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012).

Os tumores mamários aumentam em frequência das glândulas mamárias craneais para as caudais, ocorrendo a maioria dos tumores nos dois últimos pares, ou seja, nas mamas caudais abdominais e inguinais (Misdorp, 2002). Destes, cerca de 60% têm origem nos pares inguinais. Embora ainda se desconheça a razão de tal ocorrência, alguns autores defendem que poderá estar relacionada com o maior volume destas glândulas e com as correspondentes alterações proliferativas em resposta aos estrogénios (Queiroga & Lopes, 2002).

Um estudo realizado por Sontas, et al., (2009), demonstrou que numa amostra de 133 tumores mamários, 22,5% dos casos tinham envolvimento das mamas torácicas, 30,1% das abdominais e 47,4% das inguinais. Mais tarde Gupta, et al., (2012), obtiveram resultados semelhantes, em que a percentagem de tumores mamários localizados nas mamas inguinais foi de 56,8%, seguido pelas abdominais com uma incidência de 35,2% e por fim pelas torácicas com 21,5%. Relativamente ao número de mamas afectadas, em 45% dos casos estava apenas afectada uma mama, em 33,3% duas, em 15,6% três e em 5,8% quatro.

Na cadela é comum a existência de múltiplos tipos histopatológicos de tumores (Misdorp, 2002). Também é frequente terem mais de uma glândula afectada e encontrar mais de uma massa tumoral na mesma mama, passando nestes casos a denominarem-se de neoplasias multicêntricas (Peleteiro M. , 1994).

Embora mais frequentes em animais de raças pequenas, não tem sido possível estabelecer uma predisposição rática para os tumores mamários (Peleteiro M. , 1994), possivelmente devido às diferentes populações de animais utilizadas como amostra nos estudos realizados por Alenza, et al., (2002) e Salas, et al., (2015).

Dentro das raças de pequeno porte as consideradas de maior risco são: os Poodles, os Chihuahuas, os Dachshunds, os Yorkshire terriers, os Bichon Maltese, e os Cocker Spaniels. Nas raças de maior porte são os: Spaniel inglês, Setter inglês, Pointer, Pastor Alemão, Dobermans, Labrador Retriever, Rottweiler e Boxers (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012).

### **3.2. Etiologia do tumor de mama**

Vários são os factores relacionados com o aparecimento e desenvolvimento de neoplasias mamárias, nomeadamente os factores genéticos, os factores hormonais entre outros (Misdorp, 2002).

#### **3.2.1. Factores genéticos - Anomalias no ADN**

Dentro dos factores genéticos consideram-se as anomalias do ADN, os genes supressores tumorais e os oncogenes. No que respeita às anomalias do ADN, a aneuploidia é um dos fenómeno mais frequentes no aparecimento dos tumores mamários da cadela, sendo significativamente mais comum em tumores malignos (62%) em comparação com os benignos. Os estudos realizados concluíram que não existem diferenças significativas entre

tumores mamários primários e metástases quanto à ploidia do ADN, nem quanto à aneuploidia e o tipo histológico do tumor, o seu grau de malignidade, o seu tamanho, ou a existência de metástases e expressão de receptores de hormonas esteróides. No entanto, defendem uma associação entre a fração de células em fase S e o prognóstico da doença, verificando que a fase S é maior nos tumores malignos e/ou aneuploides, comparativamente com os benignos e/ou diploides (Misdorp, 2002)

Relativamente aos genes supressores tumorais, o p53 é um dos mais estudados, desempenhando uma função importante no controlo da replicação do ADN, na proliferação celular e na apoptose de acordo com o anteriormente referido (Kusewitt & Rush, 2007). A proteína p53 é responsável por bloquear a divisão de células que sofreram lesões no seu ADN, razão pela qual se desenvolvem rapidamente níveis elevados desta proteína quando existe um erro no ADN celular. Consequentemente dá-se um aumento da transcrição de determinados genes alvo, como o p21 e o GADD45, os quais têm como função parar o ciclo celular e reparar o ADN, respetivamente. No caso da reparação do ADN ser completa, a proteína p53 é rapidamente degradada; ou pelo contrário, se a reparação não for eficaz a proteína p53 vai desencadear o processo de apoptose (Kusewitt & Rush, 2007). Deste modo quando a proteína p53 se encontra inactiva, as lesões do ADN vão permanecer e a célula vai-se multiplicando, permitindo a manutenção da mutação no genoma. Assim se entende que a expressão da proteína p53 defeituosa esteja associada a uma elevada taxa de proliferação e progressão tumoral, assim como a um maior risco de recidivas e a um pior prognóstico de doença oncológica (Euler, 2011).

Zuccari, et al.,(2012) referem no seu estudo que a caveolina -1 também atua como um gene supressor tumoral, já que se detetou uma diminuição da sua expressão em tecidos mamários com neoplasia relativamente aos tecidos normais.

Quanto aos oncogenes, o oncogene HER2 é o responsável pela expressão de factores de crescimento, e encontra-se presente na maioria das neoplasias malignas primárias da cadelas mas não nas benignas, não tendo contudo sido associado com a invasão vascular ou com a metastização regional (Misdorp, 2002). Segundo Sorenmo et al.,(2012), foi identificada a sua sobre-expressão em 17-29% dos casos de tumores mamários malignos em cadelas. Alguns estudos relacionam a sobre-expressão do HER2 com características histológicas negativas e com uma menor taxa de sobrevivência. Em oposição existem outros dois estudos que associam a sobre-expressão do HER2 a uma maior taxa de sobrevida (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012).

Outros oncogenes de interesse são o BRCA2 e o RAD51. O gene BRCA2 encontra-se sobre-expresso em 50% dos casos de adenocarcinoma mamário em que coexiste metastização ao nível dos gânglios linfáticos, e de modo similar para o gene RAD51 que também parece estar relacionado com tumores mais agressivos (Klopfleisch & Gruber, 2009).

### **3.2.2. Factores hormonais**

As hormonas mais frequentemente associadas ao desenvolvimento tumoral são os estrogénios, a progesterona, os androgénios, a prolactina e a hormona de crescimento (Misdorp, 2002).

Os estrogénios e a progesterona são hormonas necessárias para o normal desenvolvimento da glândula mamária, pois para além de serem mitogénicos do epitélio da glândula mamária, induzem ainda a proliferação epitelial dos ductos intralobulares o que resulta no aumento do volume da mama (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012). O facto de os tumores mamários ocorrerem principalmente em fêmeas, ou no caso de surgirem em machos estarem geralmente associados à presença de tumores testiculares produtores de estrogénios, como os sertolinomas, faz realçar o importante papel que estas hormonas desempenham no desenvolvimento dos tumores de mama (Misdorp, 2002).

Os estudos têm demonstrado que as variações hormonais fisiológicas que ocorrem na glândula mamária não influenciam significativamente no risco de desenvolvimento tumoral. Contudo, a administração de hormonas exógenas (progestinas e estrogénio) tem sido associada com um risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias de 2-3 vezes superior ao dos animais não sujeitos a este tipo de terapêutica (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012).

Embora sem consenso absoluto, é aceite que baixas doses de progestinas administradas isoladamente aumentam o risco do aparecimento de tumores benignos, enquanto, que a combinação de estrogénios e progestinas aumenta o risco de desenvolvimento de tumores malignos (Misdorp, 2002; Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012).

Segundo Misdorp (2002), cerca de 40-60% dos tumores benignos e malignos apresentam 3 tipos de receptores: para a progesterona, para os estrogénios e para a prolactina. Sorenmo et al.,(2012) referem que os tumores benignos são mais prováveis de expressar receptores hormonais do que os tumores malignos, o que lhes confere um prognóstico mais favorável. O mesmo estudo realça que o estado dos receptores hormonais também é influenciado pela idade do indivíduo e pela fase hormonal do ciclo estrico em que este se encontra. Assim sendo, cadelas inteiras, mais novas e em estro têm maior probabilidade de apresentarem

tumores com receptores hormonais positivos, comparativamente às cadelas esterilizadas, com maior idade e em fase de anestro. Adicionalmente, a quantidade de receptores hormonais expressos é inversamente proporcional ao tamanho do tumor e à sua diferenciação em termos histopatológicos, pelo que tumores maiores e indiferenciados são menos propensos a expressar receptores hormonais do que os tumores mais diferenciados (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012). Segundo Sorenmo et al.,(2012), os tumores malignos apresentam concentrações significativamente mais altas de hormona do crescimento, IGF-1, progesterona e estradiol do que os tumores benignos.

A hormona do crescimento para além do efeito estimulador direto sobre os tecidos das glândulas mamárias, atua também indiretamente através do aumento dos níveis séricos do factor de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), o qual é responsável por estimular a proliferação celular da glândula mamária e regular a expressão de vários genes envolvidos no processo neoplásico (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012).

Um estudo realizado por Queiroga et al. (2005) demonstra que existe uma correlação positiva entre os níveis de prolactina e os de estrogénio e progesterona. Baseados nos seus resultados, apresentaram a hipótese de que a prolactina pode em parte ser produzida localmente pelas próprias células neoplásicas. Defendem ainda que, existe uma relação positiva entre a dimensão e a taxa de crescimento do tumor e os níveis de prolactina, estrogénio e progesterona presentes nos tecidos, concluindo que estas hormonas contribuem para a proliferação celular principalmente no caso de tumores malignos mamários (Queiroga, Pérez-Alenza, Silvan, Peña, Lopes, & Illera, 2005).

### **3.2.3. Outros factores**

O peso corporal dos indivíduos, mais especificamente durante o período da puberdade (9-12 meses de idade), tem demonstrado ter um efeito significativo sobre o risco do desenvolvimento de tumores mamários. A um menor peso corporal durante esta etapa de desenvolvimento associa-se um efeito preventivo significativo contra o desenvolvimento dos tumores mamários (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012).

Na mulher, a obesidade tem vindo a ser considerada como um factor de risco para o desenvolvimento de neoplasias mamárias após a menopausa. Um dos mecanismos propostos para a obesidade poder despoletar o desenvolvimento tumoral, consiste na acção desempenhada pelo estrogénio, leptina e adiponectina. O tecido adiposo funciona como um produtor de estrogénio devido à acção da aromatase nele presente, convertendo os androgénios em estrona, a qual é posteriormente convertida em 17 $\beta$ -estradiol. Assim, o aumento do tecido adiposo pode predispor a uma maior exposição das glândulas mamárias ao estrogénio (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012). A leptina, é produzida pelos

adipócitos e apresenta a capacidade de inibir a apoptose e de estimular a proliferação celular. Quanto à adiponectina, e embora ela também seja produzida pelo tecido adiposo, apresenta uma actividade inversa à leptina, ou seja, diminuí a proliferação celular e promove a apoptose (Cleary, Grossmann, & Ray, 2010).

#### **4. DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO TUMOR DE MAMA**

O diagnóstico clínico de tumores mamários deve ter por base uma boa história pregressa que contemple informações relevantes como: a data de início da lesão, o tamanho, o número, a consistência, a existência ou não de prurido, a velocidade de crescimento, a presença ou ausência de ulceração e a fixação à pele e tecidos envolventes. Também são importantes as informações relativas à idade, raça, existência ou não de pseudo-gestações e irregularidades nos ciclos éstricos, data do último cio e fármacos que possam ter sido utilizados (em particular os progestagénios) (Peleteiro M. , 1994).

Os tumores mamários são geralmente fáceis de detetar através de um exame físico objectivo de rotina. No entanto cadelas de alto risco, especificamente cadelas inteiras e com mais idade, devem ser sujeitas a um exame mais aprofundado das glândulas mamárias, incluindo os mamilos (avaliar a presença ou não de secreção) e dos linfonodos regionais. A palpação da glândula mamária não permite a deteção de nódulos inferiores a 0,5 cm de diâmetro. Um estudo recente refere que 70% das fêmeas inteiras exibem mais de um tumor na altura do diagnóstico clínico (Peleteiro M. , 1994; Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012).

Em todos as situações clinicamente suspeitas é recomendada a realização sistemática de radiografias ao tórax para pesquisa de metástases, não obstante o facto destas poderem ter dimensões reduzidas (inferiores a 0,5 cm) ou estar encobertas pelo coração ou pelos grandes vasos, podendo não ser visualizadas (Peleteiro M., 1994).

Adicionalmente, os animais suspeitos de carcinoma inflamatório devem realizar provas de coagulação pois correm o risco de desenvolver coagulação intravascular disseminada (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012).

##### **4.1. Classificação e estadiamento histopatológico**

A análise histopatológica é a técnica de eleição para o diagnóstico do tumor da mama (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012). No que diz respeito aos tumores mamários a histopatologia é na maioria dos casos realizada através de biópsia excisional, dado que nesses casos a excisão cirúrgica é o tratamento de eleição. Nessas situações não é de

importância absoluta a realização de biópsia prévia, exceto em casos especiais como os de recidiva de neoplasias em animais idosos (Peleteiro, 1994). No entanto, há autores que defendem que a realização de biópsia pré cirúrgica é útil e decisiva para a escolha da melhor terapêutica a instituir, permitindo diferenciar lesões neoplásicas de não neoplásicas que não necessitem de ser sujeitas a cirurgia (Morris & Dobson, 2001).

Para que o material enviado para análise histopatológica seja representativo, é necessário recolher amostras de vários locais do tumor, procurando incluir sempre material de zonas de transição entre as lesões e os tecidos aparentemente são.

Em 1974 a organização Mundial de Saúde, publicou a primeira classificação histológica internacional de tumores em animais domésticos. Mais tarde Misdorp et al. (1999) apresentaram uma nova classificação que é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde, e que considera 3 grupos: tumores malignos, tumores benignos e lesões não neoplásicas onde se inserem as hiperplasias e displasias de mama. A classificação de Misdorp et al. (1999) é apresentada nos quadros 1, 2 e 3 do Anexo I.

Recentemente, Goldschmidt et al. (2011) propuseram uma nova classificação e nomenclatura histológica para os tumores e displasias da glândula mamária em canídeos. Algumas das neoplasias que foram adicionadas no novo sistema de classificação estão descritas como entidades específicas, e incluem o carcinoma cribriforme (que pertence ao grupo dos carcinomas simples) e o comedocarcinoma. Outros foram identificados como variantes malignas de tumores benignos já descritos e incluem o carcinoma ductal, o adenoma ductal anteriormente classificado como adenoma basaloide, e o adenoma intraductal papilar.

Através do estadiamento histopatológico é possível atribuir um grau de malignidade histológica à neoplasia (Peleteiro & Correia, 1993). Este estadiamento é atualmente feito com base no sistema de pontuação de Elston e Ellis, que avalia 3 características morfológicas: o grau de diferenciação glandular (avaliado com base na formação tubular); o pleomorfismo nuclear e o número de mitoses por campo. Cada um destes critérios é classificado de 1-3 pontos, que posteriormente são somados de forma a obter o grau de malignidade histológica. Assim, o grau de malignidade I corresponde a uma pontuação total de 3 a 5 pontos, o grau II corresponde a um somatório de 6 ou 7 pontos e finalmente o grau III corresponde a um total de 8 ou 9 pontos (Tavasoly, Golshahi, Rezaie, & Farhadi, 2013; Misdorp, 2002).

## 4.2. O estadiamento clínico e o sistema TNM

O estadiamento clínico das neoplasias mamárias tem um papel importante como indicador de prognóstico e decisor do estabelecimento de um tratamento adequado (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012). Os tumores mamários atualmente são classificados de acordo com uma versão modificada do sistema defendido por Owens em 1980. Este sistema tem por base a avaliação de vários critérios como: a dimensão do tumor primário (T), a presença ou ausência de metastização nos linfonodos regionais (axilares e inguinais) (N) e a presença ou ausência de metastização à distância (pulmão, fígado ou linfonodos esternais e sublombares) (M). Este sistema de classificação denominado TNM, só pode ser utilizado em carcinomas (Tabela 1). No caso de tumores múltiplos, deve ser atribuída uma classificação individual a cada neoplasia (Peleteiro & Correia, 1993).

**Tabela 1-** Classificação TNM dos tumores mamários em canídeos (adaptado de Sorenmo et al. 2012 e de Peleteiro & Correia,1993 )

Tumor primário		Linfonodo Regional		Metástases à distância	
<b>T1(a,b,c)</b>	< 3cm de diâmetro máximo	<b>N0</b>	Ausência de metástases	<b>M0</b>	Sem metástases detectadas
<b>T2(a,b,c)</b>	3-5cm de diâmetro máximo	<b>N1(a,b)</b>	Presença de metástases	<b>M1</b>	Com metástases detectadas
<b>T3(a,b,c)</b>	>5cm de diâmetro máximo			<b>Mx</b>	Impossível avaliação da existência de metástases

**Legenda-** As categorias T1,T2 e T3 podem ainda dividir-se em três sub-categorias (a, b ou c), no caso de o tumor não estar aderente pertencerá à sub-categorias **a** , caso esteja aderente aos planos superficiais será da sub-categorias **b**, se estiver aderente aos planos profundos fará parte sub-categorias **c** (Peleteiro & Correia,1993).

A categoria N1 também se subdivide em **a** e **b**, correspondendo a sub-categoria **a**, a linfonodos móveis e a sub-categoria **b** a linfonodos fixos ao tecidos adjacentes (Peleteiro & Correia,1993)

Posteriormente à classificação da neoplasia, é possível estabelecer qual é o estágio do processo tumoral em que esta se encontra. Quando existir mais do que uma neoplasia, considera-se sempre a fase da neoplasia de categoria mais elevada, ou seja, a de maior gravidade (Peleteiro & Correia, 1993).

**Tabela 2-**Estadiamento dos tumores mamários de canídeos (adaptado de Sorenmo et al.2012)

Estádio	Dimensão	Linfonodo Regional	Metástases à distância
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
IV	Qualquer T	N1(positivo)	M0
V	Qualquer T	Qualquer N	M1 (metástases)

## **5. TERAPÊUTICA DO TUMOR MAMÁRIO**

A terapêutica do tumor de mama deve compreender a terapêutica médica e/ou cirúrgica

### **5.1 Terapêutica Médica**

Ao contrário do que se verifica na mulher, na cadela são poucos os estudos realizados sobre a utilização e eficácia da quimioterapia (Lana, Rutteman, & Withrow, 2007). No entanto, alguns estudos *in vitro* já demonstraram a eficácia de alguns compostos quimioterápicos como: a doxorrubicina, a cisplatina, a carboplatina, o 5-fluorouracil e a ciclofosfamida (Sartin, Barnes, Toivio-Kinnucan, & Wright, 1993; Lana, Rutteman, & Withrow, 2007). Contudo ainda não existem protocolos exatos para esta opção terapêutica, são necessários mais estudos para determinar qual a combinação de compostos quimioterápicos mais indicados para o tratamento dos tumores mamários de cadelas. Também a utilização de inibidores da Cox-2 neste tipo de terapêutica tem vindo a ser sugerida como tendo uma eficácia terapêutica e preventiva (Lana, Rutteman, & Withrow, 2007).

Do mesmo modo relativamente à radioterapia, ainda não existe informação suficiente sobre a sua utilização e eficácia (Rutteman & Kirpensteijn, 2003; Lana, Rutteman, & Withrow, 2007). A sua aplicação tem sido reservada para casos em que a remoção cirúrgica é incompleta ou mesmo impossível (Lana, Rutteman, & Withrow, 2007).

Como já foi anteriormente referido, a realização precoce de OVH previne o desenvolvimento de tumores mamários nas cadelas (Misdorp, 2002). No entanto, como terapia adjuvante à mastectomia a OVH não aumenta o tempo de sobrevivência pós-cirúrgica dos doentes (Misdorp, 2002; Lana, Rutteman, & Withrow, 2007). Uma opção terapêutica na hormonoterapia é a utilização de bloqueadores dos receptores hormonais. O composto mais conhecido deste grupo é o tamoxifeno, o qual embora seja já amplamente utilizado no Homem, nas cadelas origina vários efeitos secundários significativos como: tumefação vulvar, descargas vaginais, incontinência urinária, infecções do tracto urinário, piómetra e sinais de estro (Rutteman & Kirpensteijn, 2003; Lana, Rutteman, & Withrow, 2007).

### **5.2 Terapêutica Cirúrgica**

Na maioria dos tumores mamários em canídeos, a abordagem terapêutica de eleição é a excisão cirúrgica (exceto em casos inoperáveis como o carcinoma inflamatório ou a presença de metástases). A excisão cirúrgica tem como vantagens permitir o diagnóstico

histopatológico, poder ser curativa, atrasar a progressão da doença e melhorar a qualidade de vida do paciente (Fossum, et al., 2007).

A extensão da excisão pode ser variável, e para escolher a técnica cirúrgica mais adequada é necessário ter em conta factores como: o número e o tamanho do tumor, a sua localização e ainda o estado clínico e a idade do paciente (Misdorp, 2002). As técnicas cirúrgicas que podem ser utilizadas na excisão de tumores mamários são: nodulectomia/ lumpectomia, mastectomia simples, mastectomia regional e mastectomia unilateral ou bilateral (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012).

Na nodulectomia apenas é removida a massa em si, e está indicada para tumores com diâmetro até 0,5 cm, situados na periferia da glândula mamária de consistência firme e que não apresentem aderências aos tecidos adjacentes (Misdorp, 2002). De acordo com as recomendações atuais, para animais com um único tumor mamário com ou sem análise histopatológica é suficiente a realização de uma nodulectomia, desde que esta permita remover completamente o tumor da glândula mamária (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012).

No caso de tumores de dimensão inferior a 1 cm de diâmetro que estejam fixos aos tecidos adjacentes ou apresentem ulceração, a opção cirúrgica pode ser a excisão apenas da glândula mamária afectada ou seja será suficiente a realização de uma mastectomia simples (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012).

Segundo Misdorp (2002), quando se trata de um tumor maligno capaz de invadir a circulação linfática, tanto a nodulectomia como a mastectomia simples aumentam o risco de recorrência local, comparativamente com a mastectomia regional ou total da cadeia.

A mastectomia regional consiste na excisão da glândula mamária em que se encontra o tumor e das glândulas adjacentes. Esta técnica está indicada quando existem múltiplos tumores nas glândulas adjacentes da mesma cadeia ou quando as lesões se localizam entre duas glândulas (Fossum, et al., 2007).

A mastectomia total da cadeia envolve a exérese da cadeia mamária completa, e tem indicação quando existem vários tumores ao longo de toda a cadeia mamária. A realização de uma mastectomia total da cadeia unilateral pode demorar menos tempo e ser menos traumática para o paciente e por isso, melhor tolerada do que múltiplas nodulectomias. Na presença de múltiplas massas em ambas as cadeias mamárias está indicada a realização de uma mastectomia total bilateral, que poderá ser realizada em um ou dois tempos cirúrgicos (Fossum, et al., 2007).

Os linfonodos inguinais devem ser sempre removidos não só nos casos em que se procedeu à excisão da glândula mamária inguinal (estas duas estruturas estão intimamente associadas), mas também quando os linfonodos se encontram hipertrofiados ou quando for detetada presença de células neoplásicas nos mesmos. Relativamente aos linfonodos axilares, segundo alguns autores, estes raramente são invadidos por células neoplásicas, devendo ser removidos apenas em caso de hipertrofia ou presença de células tumorais (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012).

## **6. Prognóstico**

Os fatores geralmente associados ao prognóstico do tumor da mama são: 1) o tamanho do tumor, 2) o envolvimento dos linfonodos, 3) o estadiamento clínico, 4) a expressão de recetores hormonais, 5) o grau de malignidade e 6) o tipo histológico (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012).

**1. Tamanho do tumor:** alguns estudos indicam que cadelas com tumores de diâmetro inferior a 3 cm têm um tempo de sobrevivência mais longo que cadelas com tumores maiores (Kurzman & Gilbertson, 1986). Os tumores com diâmetro superior a 3 cm estão associados a um aumento do risco de recidiva e diminuição do período de ausência do processo neoplásico identificável (Martín de las Mulas et al., 2005). No entanto existem autores que consideram que tal só acontece quando o diâmetro do tumor é superior a 5cm (Morris et al., 1993). Segundo Chang et al., 2005, existe uma relação direta entre a previsão de um prognóstico desfavorável e o aumento do diâmetro do tumor, assim como a ocorrência de metástases nos linfonodos regionais em tumores de diâmetros superiores a 5cm.

**2. Envolvimento dos linfonodos:** A presença de metástases nos linfonodos regionais tem sido relacionada com um prognóstico desfavorável (Chang et al., 2005). Num estudo em cadelas levado a cabo por Karayannopoulou, Kaldrymidou, Constantinidis e Dessiris (2005), observou-se uma taxa de sobrevivência, 2 anos após a mastectomia, de 60% para as que não tinham metastização e de 20% para as cadelas que com linfonodos infiltrados com metástases.

**3. Estadiamento tumoral:** Através do sistema TNM é possível avaliar a extensão do processo tumoral. Esta avaliação tem por base o tamanho do tumor e o grau de infiltração nos tecidos circundantes (Misdorp, 2002). Chang et al., 2005 demonstraram a existência de uma correlação positiva entre fases mais avançadas da doença e um pior prognóstico. Philibert et al., (2003) demonstrou que as cadelas com tumores no estágio I,II,III, e IV do sistema de classificação TNM apresentaram, após a mastectomia, um período médio de sobrevivência de 24,19, 15 e 12 meses respetivamente.

**4. Expressão de recetores hormonais:** A expressão de recetores é progressivamente inferior nas displasias/hiperplasias, nos tumores benignos e, por fim, nos tumores malignos, pelo que se considera que a expressão destes recetores está relacionada com um melhor prognóstico (Misdorp, 2002).

**5. Tipo histológico e grau de malignidade:** O prognóstico está relacionado com o nível de diferenciação tumoral. Os tumores malignos quanto menos diferenciados, e com maior grau de malignidade, estão associados a pior prognóstico (Euler, 2011). Relativamente ao grau de malignidade, Karayannopoulou et al. (2005) descrevem que o prognóstico é pior para animais com carcinomas de grau III de malignidade, quando comparado com animais com tumores de grau I e II.

## **7. Classificação molecular dos tumores mamários**

### **7.1 Classificação molecular na Mulher**

Tanto na mulher como na cadela, a neoplasia mamária apresenta-se como uma doença complexa. O estudo da biologia molecular dos tumores mamários tem sido uma das grandes áreas de investigação em Medicina Humana, com o objectivo de detetar o mais precocemente possível a doença oncológica antes da sua disseminação pelo organismo do paciente. Actualmente a classificação molecular dos tumores mamários utilizada na mulher está subdividida em 6 subtipos moleculares, são eles: *Luminal A e B*, *HER-2*, *Basal-like*, *Normal-like* e *Claudin-low*, descritos por Eroles, Bosch, Pérez-Fidalgo e Lluch (2012):

- 1. Luminal A:** É o subtipo mais comum, representando cerca de 50-60% do total de tumores mamários. É caracterizado pela expressão de genes ativados pelo fator de transcrição RE. O seu perfil imunohistoquímico é caracterizado pela expressão de recetores de estrogénio (RE), Recetores de progesterona (RP), citoqueratina (CK) 8/18 e linfoma de células B 2 (Bcl-2); pela ausência de expressão de HER-2 e por uma baixa taxa de proliferação celular. Geralmente têm baixo grau de malignidade. Os doentes com este subtipo de tumor apresentam um bom prognóstico com uma taxa de recidiva relativamente baixa (27.8%) e um tempo de sobrevivência médio após a recidiva de 2,2 anos. O tratamento é baseado em inibidores da aromatase de 3ª geração, moduladores seletivos dos recetores de estrogénio (tamoxifeno) e reguladores seletivos puros dos recetores do estrogénio (fulvestrant).
- 2. Luminal B:** Este subtipo tumoral representa 10-20 % do total dos tumores mamários, e em comparação com o Luminal A tem um fenótipo mais agressivo, um pior prognóstico, um grau histológico mais elevado e um maior índice de proliferação celular. A principal diferença biológica entre este subtipo e o luminal A é o aumento acentuado da expressão de genes de proliferação, e também a expressão do recetor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e de HER-2. Relativamente ao perfil imunohistoquímico é caracterizado pela expressão de RE e ausência de expressão de HER-2 ou expressão de RE e de HER-2. Cerca de 6% dos casos são RE/HER-2 negativos. O tempo de sobrevivência média após a recidiva é menor do que no luminal A (1,6 anos), o seu tratamento é baseado em tamoxifeno e inibidores da aromatase. Respondem melhor à quimioterapia neoadjuvante do que o tipo *luminal A*, atingindo-se uma resposta completa em 17 % dos tumores luminais B em comparação com os 7% nos luminal A.
- 3. HER-2-positivo:** Este subtipo ocorre entre 15 e 20% dos tumores mamários. Apresentam uma sobreexpressão de genes relacionados com a proliferação celular. Morfologicamente, estes tumores são altamente proliferativos, 75% possuem um grau histológico elevado e mais de 40% têm mutações no gene p53. O perfil imunohistoquímico é caracterizado pela sobreexpressão de HER-2 e ausência de expressão de RE e RP. Apesar de no geral apresentarem um pior prognóstico, os tumores HER-2-positivos foram subdivididos em 3 subtipos, já que um subtipo

apresenta uma taxa de sobrevivência a 10 anos de 12% e os outros dois de 50-55%. O tratamento anti-HER-2 com trastuzumab permitiu o aumento da sobrevivência associada a este subtipo de tumores.

**4. Basal-like:** Representa 10-20 % do total dos tumores mamários sendo caracterizado pela ausência de expressão dos 3 principais receptores RE, PR e HER-2 pelo que por vezes são denominados na prática clínica como a Tripla negativa, do inglês "*Triple Negative*". Clinicamente surgem numa idade precoce, tendo diâmetro elevado na altura do diagnóstico, um alto grau de malignidade e uma grande frequência de metastização nos linfonodos. O seu padrão de metástases é muito agressivo com localização no pulmão, sistema nervoso e linfonodos.

Têm uma elevada proliferação celular. O perfil imunohistoquímico caracteriza-se por ser RE-, RP-, HER-, EGFR+, CK5/17+, CK8/18+. Este subtipo tem um prognóstico mais desfavorável que os Luminais A, com uma taxa de recidiva mais elevada nos primeiros 3 anos, apesar de apresentarem boa resposta à quimioterapia. Estes tumores apresentam uma elevada taxa de mutações nos genes p53, BRAC1 e BRAC2, o que pode explicar uma maior agressividade e pior prognóstico. Uma das estratégias mais promissoras no tratamento destes tumores é o uso de inibidores da poli-ADP ribosepolimerase-1. Os quais têm um papel essencial na reparação de defeitos no ADN.

**5. Normal breast:** Representa 5-10% de todos os tumores mamários. São tumores mal caracterizados, mas sabe-se que expressam genes idênticos aos do tecido adiposo. Apresentam um prognóstico intermédio entre Luminais e *Basal-like*. Também podem ser classificados como "*Triple Negative*" devido à ausência de expressão de RE, PR e HER-2. No entanto, não são considerados *Basal-like* por serem negativos para CK5. Ainda não se percebeu bem a sua importância clínica pois a sua incidência é baixa e existem poucos estudos sobre este subtipo. Na maior parte dos casos não respondem à quimioterapia neoadjuvante.

**6. Claudin-low:** Representa 12-14% dos tumores mamários malignos. Este subtipo caracteriza-se por uma baixa expressão dos genes envolvidos nas junções celulares (tight junctions) e na adesão intercelular como a Claudina-3, -4, -7, Cingulina, Ocludina e a E-caderina. Estes tumores têm também uma baixa expressão de RE, RP e HER-2 existindo, em

cerca de 20% dos casos marcação positiva para os recetores hormonais, à semelhança do verificado com os tumores *basal-like*. Em termos de prognóstico encontram-se entre os luminais e *basal-like*. Apresentam ainda uma fraca resposta à quimioterapia neoadjuvante.

## 7.2 Classificação molecular na cadela

Em Medicina Veterinária tem-se vindo igualmente a verificar um interesse crescente no estudo e classificação molecular dos tumores mamários da cadela. À semelhança do que acontece em Medicina Humana, este esquema de classificação permitirá um melhor conhecimento sobre a biologia tumoral, sobre o percurso clínico da doença, e ainda uma maior investigação de novas estratégias terapêuticas e seus efeitos (Gama, Alves & Schmitt, 2008).

Tendo por base a classificação na mulher, Gama et al. (2008), através da técnica de imunohistoquímica, utilizando 5 marcadores moleculares (RE, HER-2, CK5, p63 e P-caderina), identificaram 4 subtipos de carcinomas mamários caninos: *Luminal A*, *Luminal B*, HER-2 positivo e *Basal-like*.

O subtipo *Luminal A* foi associado a um baixo grau de malignidade (I ou II), com uma baixa taxa de proliferação, estando presente maioritariamente em tumores do tipo complexo. Os subtipos *Basal-like* e HER-2-positivo foram frequentemente associados aos tumores de tipo simples e aos carcinosarcomas. O subtipo *Basal-like* foi o que esteve mais frequentemente presente em tumores de elevado grau de malignidade (III), com elevada taxa de proliferação e pior prognóstico.

Posteriormente Sassi, Benazzi, Castellani e Sarli (2010), utilizando um conjunto de 5 anticorpos dirigidos contra os RE, RP, HER-2, CK14 e CK5/6, identificaram 3 subtipos moleculares: *Luminal A*, *Luminal B* e *Basal-like*. Nesse estudo, verificou-se uma associação entre o subtipo *Luminal A* com tumores de grau I e o subtipo *Luminal B* com tumores de grau II e III. Em oposição ao estudo de Gama et al. (2008), não se identificaram tumores HER-2-positivo, assim como não foi observada correlação entre a classificação molecular dos tumores e a sobrevivência.

Em ambos os estudos não foi identificado o subtipo *Normal-like* (existente na mulher). Mais recentemente Kim, Lim, Im, Kim e Sur (2012) levaram a cabo um estudo, com o objetivo de determinar se nos tumores mamários caninos, existia uma distinção entre o subtipo *Basal-like* e o Triple Negative, distinção já identificada no cancro da mama da mulher (Eroles et al., 2012). Para tal, basearam-se na expressão de 4 marcadores basais (CK5/6, CK14, p63 e EGFR).

Os tumores foram classificados em 2 grupos, de acordo com a expressão de RE, RP e HER-2, como sendo: *Triple Negative* e *Non-triple Negative*. Os resultados obtidos mostram uma percentagem de tumores *Triple Negative* de 18,7% e de tumores *Non-triple Negative* de 81,3%. No que diz respeito aos tumores *Triple Negative*, 91,1% destes corresponderam ao subtipo *Basal-like* e 8,9% ao subtipo *Normal-like*. Os autores concluíram que o subtipo *Triple Negative* apresenta características relacionadas com tumores mais agressivos e de pior prognóstico, sugerindo contudo a realização de mais estudos para confirmar a existência do subtipo *Basal-like* como entidade separada.

Num estudo com uma amostra de 20 cadelas com carcinomas mamários, Beha et al. (2012) identificaram uma discordância de 35% entre o perfil fenotípico do tumor primário e o fenótipo das metástases nos linfonodos. Noutro estudo mais recente, embora limitado a 5 casos, Beha et al. (2014), a discordância foi de 40% entre o perfil fenotípico do tumor primário e o fenótipo das metástases nos linfonodos. Estes autores sugerem que esta discordância pode dever-se a uma seleção de uma subpopulação de células com maior agressividade e capacidade de metastização. Assim sendo, a classificação molecular das metástases nos linfonodos, será um método fundamental para a avaliação do prognóstico e adequação do tratamento.

## **8. O oxigénio tecidual**

O oxigénio é um elemento fundamental em inúmeras reações das vias metabólicas. Em condições fisiológicas, o aporte de oxigénio aos tecidos é adequado às funções que estes desempenham, pelo que quando existe uma diminuição da sua actividade, as vias metabólicas deixam de funcionar normalmente, ocorrendo repercussões em todo o organismo (Silva, 1984). Consideremos o oxigénio no tecido saudável e tumoral.

### **8.1. O oxigénio no tecido saudável**

Em teoria, todo o oxigénio captado a nível dos pulmões é transportado para os tecidos periféricos, dependendo de duas variáveis: 1) O débito cardíaco, 2) O teor de oxigénio do sangue arterial, o qual depende da concentração de hemoglobina e da capacidade de oxigenação pulmonar do sangue (Silva, 1984).

No sentido de tentar minimizar o risco de lesão oxidativa por excesso de oxigénio (hiperoxia), como por privação de oxigénio (hipóxia), as pressões parciais intracelulares de oxigénio são mantidas num intervalo muito estreito de valores. No entanto, determinadas variações na pressão parcial de oxigénio nos tecidos são possíveis (exercício físico exagerado ou elevadas altitudes) (Silva, 1984).

A hipoxia resulta de um fornecimento inadequado de oxigénio aos tecidos, o que pode ser causado por várias condições clínicas como: baixa pressão parcial de oxigénio no sangue arterial (doenças pulmonares); diminuição da capacidade de transporte de oxigénio pelo sangue (devido a anemia, a formação de metahemoglobina ou a envenenamento por monóxido de carbono); diminuição da perfusão tecidual, local ou generalizada e deterioração da geometria de difusão. Definem-se assim 4 tipos de hipoxia: 1) a hipoxia aguda, 2) a hipoxia crónica, 3) a hipoxia anémica e 4) a hipoxia tóxica (envenenamento por cianeto ou por monóxido de carbono) (Hocke & Vaupel, 2001).

A hipoxia aguda é consequência de um fluxo sanguíneo inadequado nos tecidos. Na presença de um tumor, a vascularização nele existente tem um desenvolvimento desorganizado, com anomalias estruturais e funcionais e ausência de receptores membranares fisiológicos. Todos estes factores podem originar alterações vasculares como dilatações e espasmos responsáveis pelo desenvolvimento deste tipo de hipoxia (Vaupel & Harrison, 2004).

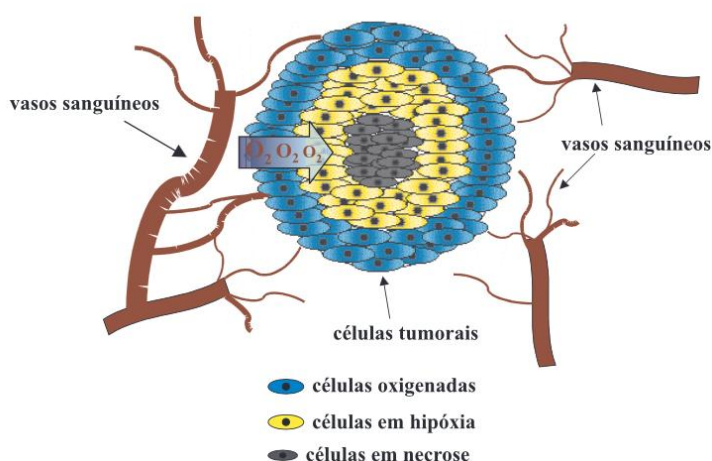
A hipoxia crónica por seu lado, é o resultado da elevada proliferação celular. As novas células formadas empurram as restantes para a periferia, de modo a que se verifica uma redução gradual do aporte sanguíneo a essas células. Assim, à medida que o tumor vai crescendo o fornecimento de oxigénio às células mais afastadas torna-se cada vez menor, uma vez que o ritmo de crescimento tumoral é de tal forma rápido que não é acompanhado por um correspondente desenvolvimento vascular adequado (Figura 6) (Vaupel & Harrison, 2004). Por esse motivo originam-se zonas de hipoxia no interior da massa tumoral. Esta hipoxia vai ativar o factor indutível por hipoxia – 1 (HIF-1) e o factor indutível por hipoxia – 2 (HIF-2) os quais vão ativar genes angiogénicos, aumentando assim a densidade e permeabilidade vascular, e consequentemente o crescimento tumoral (Arvelo & Cotte, 2009; Lapa, et al., 2015).

No que respeita à hipoxia anémica, ela é causada pela menor capacidade de transporte de oxigénio pelo sangue, devido à anemia originada pelo tumor (Vaupel & Harrison, 2004).

A hipoxia tumoral parece estar fortemente associada ao desenvolvimento do processo tumoral, à progressão maligna do tumor, à presença de metástases e à resistência à terapêutica instituída ao doente (Arvelo & Cotte, 2009). A hipoxia pode ainda provocar várias alterações na célula tumoral, denominadamente, paragem do ciclo celular, substituição da respiração oxidativa por respiração não oxidativa, promoção da angiogénese, inibição da apoptose, sobre-expressão de factores de crescimento e alterações proteómicas que capacitam as células tumorais a adaptarem-se rapidamente à privação de oxigénio, sobrevivendo assim em ambientes desfavoráveis (Vaupel, 2004).

A hipoxia está associada a uma condição de instabilidade genética, pois afecta a expressão dos genes envolvidos nos mecanismos de reparação de ADN, permitindo que as células tumorais adquiram capacidade de sobreviverem e desenvolverem-se sem necessidade de intervenção de factores de crescimento (Vaupel, 2004 ; Lapa, et al., 2015). Assim, a hipóxia é considerada um dos mecanismos com maior valor prognóstico, pois está relacionada com uma maior agressividade tumoral e maior desenvolvimento de resistência às terapêuticas (Lapa, et al., 2015). Estima-se que nos tumores sólidos, as áreas de hipóxia possam afetar cerca de 60% da massa tumoral, sendo mais frequentes nas zonas centrais da mesma (Lapa, et al., 2015).

**Figura 6-** Corte transversal de um tumor sólido ( adaptado de Oliveira & Ricardo, 2002)



**Legenda:** Demonstração da diminuição da concentração de oxigênio em relação à distância capilar

## 8.2. O oxigênio no tecido tumoral

Um estudo realizado no Homem, registou os valores da pressão parcial de oxigênio ( $PO_2$ ) no tecido mamário normal, com doença fibrocística e tumoral (com tumores de diferentes graus e tipos histológicos). Na maioria dos casos, conclui que os valores de  $PO_2$  eram distintamente mais baixos nos tumores malignos, em comparação com o tecido normal ou com a doença fibrocística, os quais têm valores de  $PO_2$  idênticos entre si (normal vs fibrocística). Não se constatou qualquer relação entre o padrão de oxigenação e a ocorrência de hipoxia, com o grau histopatológico do tumor ou mesmo com a extensão das áreas de necrose e de fibrose (Vaupel, Schlenger, Knoop, & Hockel, 1991).

Outro estudo, obteve resultados semelhantes em que os tumores malignos apresentavam valores  $PO_2$  significativamente mais baixos do que os valores presentes no tecido mamário normal ou com tumores benignos. Neste estudo, os autores encontraram ainda uma relação significativa entre os valores da  $PO_2$ , a percentagem de hipoxia e anoxia, e o grau de diferenciação tumoral (Hohenberger, Felgner, Haensch, & Schlag, 1998).

A média de valores da  $PO_2$  para o tecido mamário normal foi 57 mmHg, com uma percentagem de áreas de hipoxia e anoxia de 4% e 2% respetivamente. Relativamente aos tumores benignos a média foi de 65 - 67 mmHg. Dentro dos tumores malignos, nos classificados como diferenciados a média foi de 59 mmHg com uma percentagem de áreas de anoxia inferior a 1% e para os tumores pouco diferenciados e indiferenciados a  $PO_2$  foi em média de 36mmHg e de 13mmHg com uma percentagem de áreas de anoxia de 11% e 21% respetivamente (Hohenberger, Felgner, Haensch, & Schlag, 1998).

Pacientes que apresentavam linfonodos hipertrofiados demonstraram ter uma média de valores de  $PO_2$  mais baixos, mas sem diferenças estatisticamente significativas. No entanto, esses pacientes apresentavam percentagens de áreas de hipoxia e anoxia significativamente maiores em comparação com os doentes que não sofreram hipertrofia ganglionar (Hohenberger, Felgner, Haensch, & Schlag, 1998).

## **9. Hipóxia: métodos de deteção e o seu papel no desenvolvimento tumoral**

Vários são os métodos para deteção de hipóxia tumoral. Para a escolha do método a utilizar é necessário ter-se em conta a viabilidade das abordagens disponíveis, o grau de resolução necessária, o grau de invasão do método e ainda as considerações financeiras. A hipóxia tumoral pode ser avaliada por 1) métodos diretos e 2) indiretos (Le & Courter, 2008 ).

### **9.1. Métodos diretos**

**Eléttodos de oxigénio-** trata-se de um método polarográfico que foi utilizado durante décadas. Embora a técnica permita a medição direta da  $PO_2$  do tumor, existem várias desvantagens que o tornam na prática difícil para uso geral. As suas principais limitações consistem em: impossibilidade de medição da oxigenação em determinadas micro regiões, obtenção de informações apenas extracelulares (se for pretendida informação intracelular, terá que se recorrer a outros métodos), alto custo, método invasivo, dependência da pressão, variabilidade entre observadores, incapacidade de distinguir necrose de hipóxia e falta de informação espacial sobre hipóxia (Le & Courter, 2008 ).

## 9.2. Métodos indiretos

**Métodos baseados em ressonância magnética; tomografia computadorizada e (métodos baseados) em medicina nuclear-** Consistem em técnicas imagiológicas que permitem uma avaliação da hipóxia de uma forma não invasiva, rápida, dando ainda informação sobre a heterogeneidade do tumor. No entanto, são técnicas que actualmente requerem elevados custos operacionais pelo que não são tão utilizadas (Le & Courter, 2008 ).

**Coloração imunohistoquímica-** é uma técnica intracelular com resolução espacial, na qual é utilizada coloração de marcadores endógenos de hipóxia (produtos de genes) e exógenos (químicos, fármacos), e que tem como vantagem fornecer informação da distribuição espacial da hipóxia nos tumores a um nível micro-regional (Le & Courter, 2008 ).

**Marcadores exógenos-** A utilização de marcadores exógenos de hipoxia baseia-se na utilização de marcadores injectáveis como o misonidazole e o pimonidazole (“hypoxyprobe”), os quais podem ser administrados por via endovenosa sendo reduzidos e ligados a proteínas que contêm tiol em células hipóxicas viáveis, tal ligação não é possível na presença de níveis normais ou elevados de oxigénio. Assim, ao utilizar anticorpos para deteção destas ligações é possível obter informações quantitativas sobre a oxigenação a nível intracelular. Geralmente estes compostos marcam área de hipóxia crónica com valores de PO<sub>2</sub> inferiores a 10 mmHg (Le & Courter, 2008 ).

**Marcadores endógenos-** As técnicas com marcadores endógenos de hipoxia surjem **como** um método alternativo que não necessita da administração endovenosa de marcadores para a quantificação da hipóxia. Aqui, os marcadores são genes e proteínas cujas expressões são induzidas por exposição hipóxica e que são quantificados imunohistoquimicamente a partir de biópsias do tumor. Um dos marcadores endógenos mais estudados é o fator induzível por hipoxia-1 (HIF-1), o qual regula genes que estão envolvidos no metabolismo celular, na angiogénese, no processo de metástase e apoptose (Le & Courter, 2008 ).

O HIF-1 é um heterodímero constituído por duas subunidades: HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$ . O HIF-1 $\beta$  está permanentemente activo, ao passo que o HIF-1 $\alpha$  é rapidamente degradado sob condições de normóxia e estabilizado pela hipóxia. Sob condições de hipóxia não ocorre degradação do HIF-1 $\alpha$  o que leva à sua acumulação. As sub unidades HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$ , formam um heterodímero, que migra para o núcleo ligando-se ao elemento responsivo à hipóxia HRE e promovendo a transcrição e activação de genes envolvidos na adaptação à hipóxia, sobrevivência celular, angiogénese e metastização, como por exemplo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o factor de crescimento de transformação alfa (TGF- $\alpha$ ) o transportador 1 de glicose (GLUT-1) a anidrase carbónica IX, os quais têm sido

amplamente investigados como marcadores endógenos de prognóstico (Muz, De la Puente, Azab, & Azab, 2015; Zhang, et al., 2015).

O HIF-1 tem uma função essencial quer nos mecanismos fisiológicos homeostáticos, quer nos patológicos. Em condições de hipóxia tecidual verifica-se um desequilíbrio entre a produção de fatores pro-angiogênicos e anti-angiogênicos, o que culmina no desenvolvimento rápido e caótico de novos vasos sanguíneos. É o HIF que regula o VEGF que por sua vez tem um papel vital na angiogênese. A angiogênese consiste na formação de novos vasos a partir da rede vascular já existente, e é um fenómeno que está presente em vários mecanismos fisiológicos benignos (cicatrização de feridas) e nos malignos. No entanto, no caso dos tumores, esta neovascularização é frequentemente desorganizada, sem estrutura adequada à circulação, conduzindo com frequência ao colapso. A neovascularização permite um aporte vascular, fornecendo oxigénio e nutrientes necessários para o desenvolvimento tumoral. Contudo, mais células implicam maiores necessidades de oxigénio e nutrientes originando mais hipóxia. Por sua vez, a hipóxia promove a angiogênese numa tentativa de reverter a condição de hipóxia e a apoptose celular, formando-se assim um ciclo vicioso que contribui para que o tecido tumoral se torne cada vez mais hipóxico, e com uma vasculatura excessiva mas disfuncional. O aumento da angiogênese está associado ainda à ocorrência de metástases, uma vez que o aumento da permeabilidade vascular facilita a extravasão e circulação das células tumorais para tecidos onde possam escapar ao ambiente hostil, hipóxico (Muz, De la Puente, Azab, & Azab, 2015).

O HIF-1 promove transição epitélio-mesenquimal (EMT), através do qual a expressão génica das células epiteliais é alterada, dotando-as com uma maior capacidade de migrar e de se tornarem invasivas (Muz, De la Puente, Azab, & Azab, 2015; Zhang, et al., 2015).

Estudos imunohistoquímicos em diversos modelos tumorais, têm demonstrado que a sobre expressão de HIF-1 $\alpha$  está associado a um aumento de vascularização e metastização, e consequentemente a um pior prognóstico. A inibição da actividade de HIF-1 utilizando um oligonucleótido anti-sentido (EZN-2968) deu resultados eficazes num ensaio clínico de Fase I em neoplasia maligna avançada metastática. A marcação de células hipóxicas com um pro-fármaco, ativado apenas em ambiente hipóxico, é uma das estratégias mais recentes e altamente promissoras para reduzir a ocorrência de metástases (Muz, De la Puente, Azab, & Azab, 2015).

## 10. Método para valoração PO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>

A análise dos gases sanguíneos também designada por gasometria, é um teste que permite avaliar com precisão tanto a eficácia das trocas gasosas respiratórias (oxigenação) como os parâmetros metabólicos (equilíbrio ácido-base), razão pela qual tem vindo a ser cada vez mais utilizada em emergências médicas veterinárias. Esta análise inclui a medição de: pressão parcial de oxigénio (PO<sub>2</sub>), pressão parcial de dióxido de carbono (PCO<sub>2</sub>), pH sanguíneo, saturação de hemoglobina (SO<sub>2</sub>) e ião bicarbonato (HCO<sup>3-</sup>) (Hammond & Walters, 1999; Bistner, Ford, & Raffe, 2000).

A PO<sub>2</sub> representa a tensão ou pressão do oxigénio dissolvido no sangue. A SO<sub>2</sub> também designada de oxihemoglobina, é a fração de hemoglobina disponível para se ligar ao oxigénio. A PCO<sub>2</sub> é dependente sobretudo da ventilação pulmonar e representa a tensão ou pressão de CO<sub>2</sub> dissolvido no sangue, indicando a diferença entre a produção celular e a sua remoção; enquanto que o ião bicarbonato (HCO<sup>3-</sup>) é o componente não respiratório regulado pelos rins (Irizarry & Reiss, 2009; Button, 2015).

Os aparelhos de gasometria incorporam na câmara de medição, que se encontra sempre regulada 37°C, três eléctrodos: o eléctrodo de PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub> e pH, com ânodos e cátodos de metal, submersos em líquidos ou electrólitos adequados às suas funções. Os equipamentos mais modernos de gasometria contam também com electrodos específicos, iões selectivos, para a medição de vários electrólitos (Na, K, Cl, e Ca ionizado), podendo também determinar ainda hematócrito, glucose e lactato (Ruiz, 1999).

Estes aparelhos medem diretamente os valores de pH, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, os quais são posteriormente utilizados para calcular indiretamente através do nomograma de Siggard-Andersen, a percentagem de: 1) hemoglobina saturada com oxigénio, 2) dióxido de carbono total, 3) ião bicarbonato e 4) o excesso de bases (Ruiz, 1999; Button, 2015).

Para a medição do pH do sangue total é utilizado um eléctrodo de medição de pH (Ruiz, 1999).

Já no que diz respeito à quantificação do O<sub>2</sub>, esta é feita por um polarógrafo o qual consiste num eléctrodo que gera uma corrente eléctrica durante um minuto, cuja intensidade é proporcional à quantidade de O<sub>2</sub> presente na amostra (Ruiz, 1999).

Quanto à medição de PCO<sub>2</sub> esta é feita através de um eléctrodo, que é colocado num recipiente onde a amostra de sangue e uma solução tampão de bicarbonato, estão separadas por uma membrana permeável ao CO<sub>2</sub>. Assim o CO<sub>2</sub> vai difundir-se desde o sangue até à solução tampão mudando o seu pH, que por sua vez é medido recorrendo a

um medidor de pH. Por fim, recorrendo à equação de *Henderon-Hasselban* ( $pH = pKa + \log \left( \frac{[sal]}{[ácido]} \right)$ ), é calculado o valor de dióxido de carbono (Ruiz, 1999).

Atualmente, existem analisadores de gases sanguíneos sob a forma de aparelhos portáteis que permitem realizar o teste de diagnóstico junto do doente. Estes analisadores para além de permitirem obter resultados de qualidade a um custo relativamente baixo apresentam ainda as vantagens de: facilidade de manuseamento; necessidade quantidade reduzida de amostra; rapidez na obtenção de resultados; possibilidade de utilização de sangue arterial ou venoso e controlo de qualidade interna através de um sistema que deteta e alerta quando ocorre algum tipo de erro no processamento da amostra. Estes aparelhos têm vindo a ser cada vez mais utilizados em Medicina Veterinária (Verwaerde, Lagente, Farge, F., & P., 2002; Peiró, Borges, Gonçalves, & Mendes, 2002; Kotanen & Guiseppi-Elie, 2013).

Um exemplo desses analisadores portáteis, é o aparelho i-STAT®. Os resultados obtidos pelo i-STAT®, referentes aos gases sanguíneos e electrólitos, demonstraram valores de elevada fidelidade e rigor (Grosenbaugh, Gadawski, & Muir, 1998). Utiliza sistemas de análise em cartuchos que são descartáveis e são produzidos de forma a conterem todos os componentes necessários para a realização de cada análise (Irizarry & Reiss, 2009; Abbott, i-STAT®1 System Manual, 2013).

Inicialmente o aparelho efetua uma calibração automática e em seguida a amostra em teste é movimentada para a frente de modo a entrar em contacto com os eléctrodos. O ciclo de ensaio é completado em 2 minutos e os resultados são apresentados no ecrã. Se forem detetados durante o processamento da amostra, erros eletrónicos ou mecânicos, o resultado para o parâmetro afetado é suprimido, sendo substituído por um código de erro (Abbott, i-STAT®1 System Manual, 2013). Relativamente à realização da gasometria sanguínea, a análise de sangue arterial é o padrão e o ideal, no entanto, esta análise a partir de sangue venoso pode ser uma boa alternativa, uma vez que a colheita arterial é mais dolorosa e de execução mais difícil (Shirani, Salehi, Naina, & Gholmrezaei, 2011).

A  $PO_2$  do sangue venoso é determinada pelo balanço entre a quantidade total de oxigénio fornecido e o consumo de oxigénio pelos tecidos. Consequentemente são vários os factores que interferem com a  $PO_2$  do sangue venoso, nomeadamente: o débito cardíaco, o hematócrito, a ventilação pulmonar, o metabolismo tecidual e o consumo de oxigénio pelos tecidos (Hopper, 2005).

### 1. Objetivo do estudo

O presente estudo teve como objectivo:

- 1) Quantificar o valor de  $PO_2$  e  $SO_2$ , para caracterização dos níveis de hipoxia na vascularização do tumor de mama em cadelas submetidas a cirurgia oncológica do tipo mastectomia (parcial ou total).

### 2. Materiais e Métodos

O estudo utilizou uma amostra de 32 cadelas (N=32), da espécie *Canis familiaris* do género feminino, avaliadas no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (HE-FMV ULisboa), e no Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis (CMVAA) no Barreiro. A amostra foi dividida em 2 grupos: 1) o grupo de controlo, denominado por grupo GC (N=12) formado por indivíduos submetidos a ovariectomia electiva (OVH); e 2) o grupo de estudo, denominado por grupo GM(N=20) formado por doentes submetidas a mastectomia devido à presença de doença oncológica da mama.

Todas as cadelas apenas foram incluídas no estudo após a assinatura pelos proprietários de um termo de consentimento. Os critérios de inclusão considerados para a introdução dos animais no estudo foram os seguintes :

- a) Todas as cadelas dos grupos GM e GC apresentaram um exame físico objetivo e laboratorial apto para a realização da cirurgia(OVH, mastectomia parcial ou total);
- b) As cadelas do grupo GM tinham um intervalo de idades situado entre 7-13 anos, de acordo com a bibliografia consultada;
- c) Nenhuma cadela do grupo GM foi submetida previamente a terapia hormonal para controlo do estro.

Para a determinação dos valores de  $PO_2$  e  $SO_2$  foram realizadas duas colheitas biológicas de sangue, cada uma com um volume de 0,4ml, em cada uma das cadelas. Os locais de colheita foram a veia epigástrica superficial caudal da mama e a veia safena, utilizando-se para tal, seringas de insulina e agulhas 25 G. A opção de realizar a colheita de sangue na veia epigástrica superficial caudal da mama associou-se ao facto de a maior parte dos tumores mamários na cadela se localizarem nas mamas caudais abdominais e inguinais sendo a drenagem venosa destas mamas assegurado pelas veias epigástricas superficiais

caudais da mama. Em cada doente do grupo GM foi puncionada a veia epigástrica superficial caudal associada à drenagem venosa da mama com tumor mamário.

No grupo GC, a punção da veia epigástrica superficial caudal foi realizada com as cadelas já sob anestesia, durante a fase de tricotomia e lavagem pré-cirúrgica da região abdominal. No grupo GM a punção da veia epigástrica superficial caudal foi realizada intra-cirurgicamente, e após o rebatimento da cadeia mamária sujeita a exérese, de modo a evitar uma possível disseminação de células neoplásicas e simultaneamente obter uma melhor visualização da veia. A colheita do sangue ao nível da veia safena foi realizado com o objectivo de ter uma amostra de sangue periférico, servindo assim de controlo para os parâmetros a serem analisados, sendo realizada em ambos os grupos com as cadelas já anestesiadas. Após colheita sanguínea, procedeu-se de imediato à sua análise utilizando para tal o aparelho i-STAT® da *Abbott* com o perfil analítico CG4+, indicado para a análise da gasimetria sanguínea e que avaliou os seguintes parâmetros: o pH, a pressão parcial do dióxido de carbono ( $PCO_2$ ) e do oxigénio ( $PO_2$ ), o excesso de bases (BE), o bicarbonato ( $HCO_3^-$ ), o total de dióxido de carbono ( $TCO_2$ ), a saturação de oxigénio ( $SO_2$ ) e o lactato (tabela 3).

**Tabela 3-** Parâmetros avaliados pelo CG4+ e respectivos valores referência para sangue venoso (adaptado de Abbott, i-stat produtos,2016 e Waddel,2012)

Parâmetro	Valor de referência
pH	7,31-741
$PCO_2$	41-51 mmHg
$PO_2$	30-42 mmHg
BE	(- 2)-(+3) mmol/L
$HCO_3^-$	23-28 mmol/L
$TCO_2$	24-29 mmol/L
$SO_2$	89-90 %
Lactato	0,90-1,70 mmol/L

O protocolo terapêutico peri-operatório foi igual para todas as cadelas de ambos os grupos, consistindo em: amoxicilina com ácido clavulânico (Synulox®, Laboratórios Pfizer, Lda) (10 mg/kg/IM), carprofeno (Rimadyl®, Laboratórios Pfizer, Lda) (4mg/kg/SC), buprenorfina (Bupaq 0,3mg/ml®, Richter Pharma AG) (0,02mg/kg/IM) variando apenas no facto de as cadelas do GM terem sido sujeitas a infiltração local da sutura com lidocaína a 2%

(Anesthesin ®, Laboratório Serológico). Em ambos os grupos a indução anestésica foi efetuada utilizando propofol a 1% (Propofol Lipuro 10 mg/ml (1%) ®, B. Braun, Lda) (4-6mg/kg/IV), seguida de uma manutenção anestésica com isoflurano a 2% (IsoFlo®, Esteve Veterinária), vaporizado em 1L de 100% oxigénio/minuto), em circuito semi-fechado.

Durante todo o procedimento cirúrgico, todas as cadelas foram submetidas a fluidoterapia com cristalóide NaCl 0,9%, a uma taxa de manutenção de 2 ml/kg/h.

Todos os dados obtidos foram organizados em tabelas no programa Microsoft Office Excel (Microsoft® Office 2007), e posteriormente efectuada a análise estatística dos dados através do programa *softwareR*® e respetiva extensão R *Commander*.

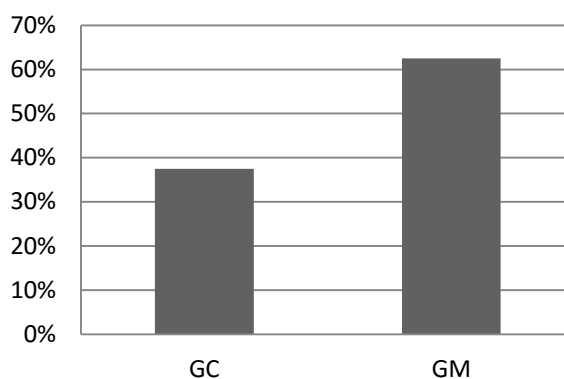
A análise estatística conciliou a estatística descritiva e a inferencial. A estatística descritiva permitiu fazer o cálculo das características amostrais: média, desvio padrão, máximo, mínimo e mediana das variáveis em estudo, a PO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>. Para a estatística inferencial utilizou-se o teste Shapiro-Wilk para testar a normalidade dos dados para cada uma das variáveis em estudo. Uma vez confirmada a normalidade da distribuição, para a comparação entre os dois grupos (entre GC e GM) foi utilizado o teste t-student. Foi considerado um nível de significância de 5% (valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos) e o nível de confiança de 95%.

## CAPÍTULO IV – RESULTADOS

Nenhuma cadela esteve anteriormente sujeita a terapia hormonal para inibição do estro.

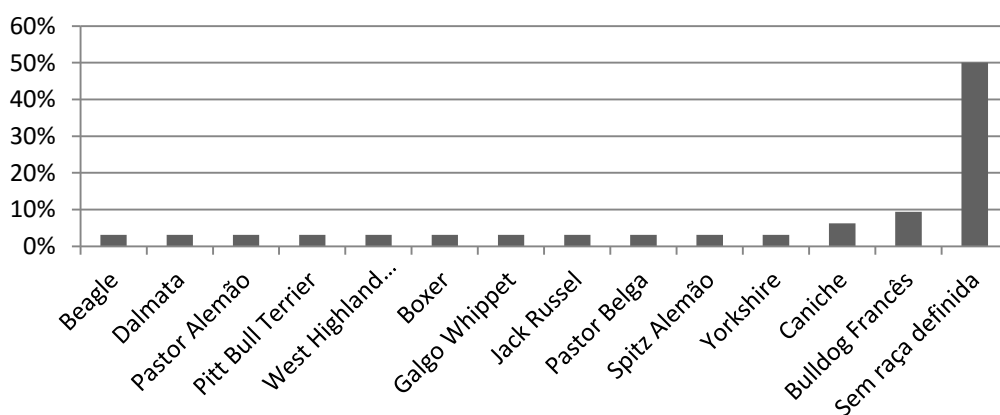
No que respeita à caracterização da amostra, o GC representou 37,5% e o GM 62,5% do total da amostra (Gráfico 1). O grupo GC teve a média de idades de  $3,00 \pm 2,99$  anos e o grupo GM uma média de  $10,75 \pm 2,43$  anos.

**Gráfico 1-**Caracterização da amostra por grupos



Relativamente à raça das cadelas, o total da amostra foi caracterizado da seguinte forma: *Beagle*, *Dalmata*, *Pastor Alemão*, *Pitt Bull Terrier*, *West Highland White Terrier*, *Boxer*, *Galgo whippet*, *Jack Russel*, *Pastor Belga*, *Spitz Alemão* e *Yorkshire* com o valor de 3,12% respetivamente, *Caniche* com 6,25 %, *Bulldog Francês* com 9,38% e sem raça definida com 50% (Gráfico 2).

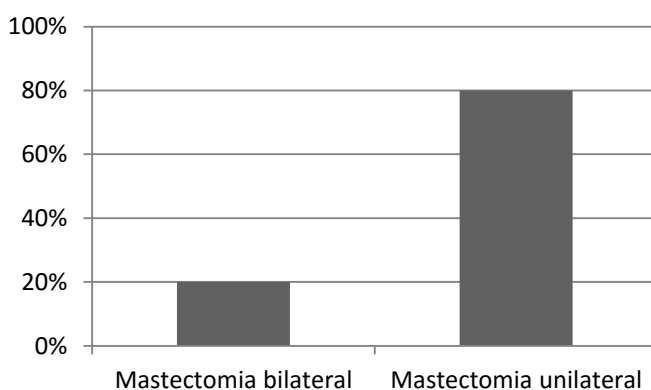
**Gráfico 2-**Caracterização da amostra por raças



Particularizando o factor raça em cada grupo verificou-se que a sua distribuição no grupo GC foi a seguinte: *Beagle*, *Dalmata*, *Jack Russel* e *Pastor Belga* com 8,33% cada uma, *Bulldog* Frânces com 25% e sem raça definida com 41,68%. Para o grupo GM os resultados foram: *Pastor Alemão*, *Pitt Bull Terrier*, *West Highland White Terrier*, *Boxer*, *Galgo whippet*, *Spitz Alemão*, e *Yorkshire* com 5% respetivamente, *Caniche* com 10 % e sem raça definida com 55%.

Tendo em conta o procedimento cirúrgico realizado, as mastectomias foram classificadas em bilateral (removidas as duas cadeias mamárias) e unilateral (remoção de apenas uma cadeia mamária). Do total dos indivíduos do grupo GM, apenas 4 realizaram mastectomia bilateral (20%) e 16 unilateral (80%) (Gráfico 3).

**Gráfico 3-**Distribuição das cadelas do grupo GM de acordo com o procedimento cirúrgico realizado

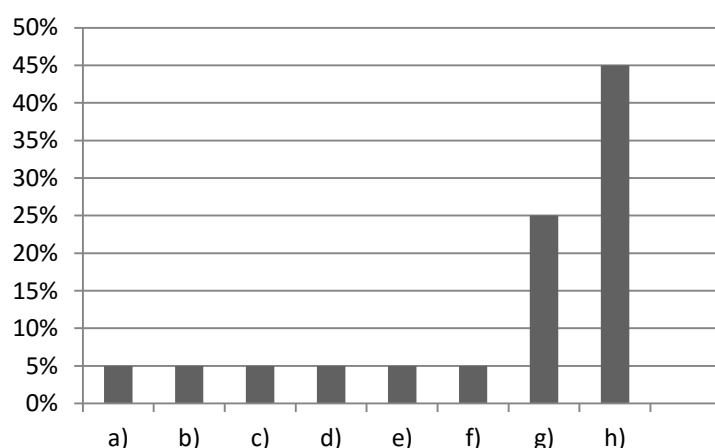


No que diz respeito à classificação histopatológica das neoplasias presentes nas cadelas do grupo GM obteve-se, por ordem crescente, a frequência apresentada na seguinte tabela, (Tabela e Gráfico 4) :

**Tabela 4-** Tipos histopatológicos de tumor e respetivas frequências

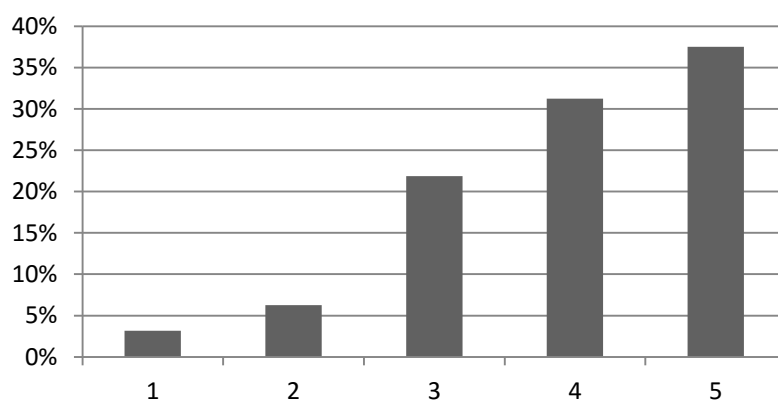
Tipo histopatológico de tumor	Frequência (%)
a) Adenoma simples	5
b) Adenoma mamário complexo do tipo tubular	5
c) Fibroadenoma quístico de baixa celularidade	5
d) Tumor misto benigno	5
e) Carcinoma mamário simples do tipo mucinoso	5
f) Carcinoma anaplásico	5
g) Carcinoma mamário de tipo sólido	25
h) Carcinoma mamário do tipo túbulo-papilífero	45

**Gráfico 4-**Classificação histopatológica dos tumores mamários presentes no grupo GM e respetivas frequências



Quanto à localização dos tumores mamários verificou-se a seguinte frequência relativamente às mamas afectadas: torácicas craneais (1) (3,15%), torácicas caudais (2) (6,25%), abdominais craneais (3) (21,85%), abdominais caudais (4) (31,25%) e as inguinais (5) (37,5%). Do total das cadelas do grupo GM, 60% possuíam mais do que um tumor mamário ou seja apresentavam tumores múltiplos.

**Gráfico 5-** Frequência relativa à localização dos tumores mamários

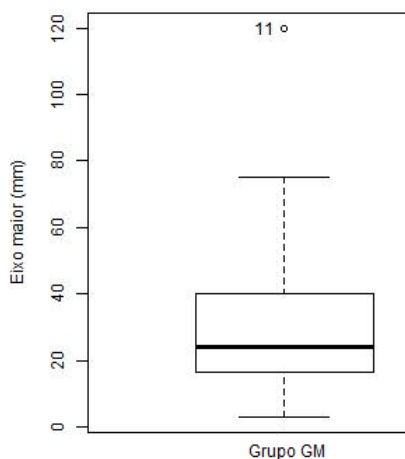


Relativamente às dimensões dos tumores mamários, foi registada a dimensão do eixo maior do tumor. No caso de tumores múltiplos considerou-se apenas a medida do tumor de maior dimensão. A média dos valores obtidos foi de 31 mm, com um valor mínimo de 3mm e um valor máximo de 120 mm, como se pode observar na figura 7. A percentagem de tumores com dimensões de eixo maior, menor que 50 mm foi de 90%.

Os resultados obtidos quanto à caracterização da amostra sanguínea permitiu verificar que em ambos os grupos (GC e GM), os valores de pH, referentes quer à amostra colhida na veia safena quer à colhida na veia epigástrica, se encontravam dentro dos valores de referência (7,31-741) em todos os indivíduos.

Observou-se ainda que das 20 cadelas que apresentavam tumores mamários, só 5 (25%) estavam esterilizadas e apenas 2 (10%) tinham sido submetidas a OVH antes do segundo estro.

**Figura 7-**Boxplot das dimensões do eixo maior dos tumores mamários

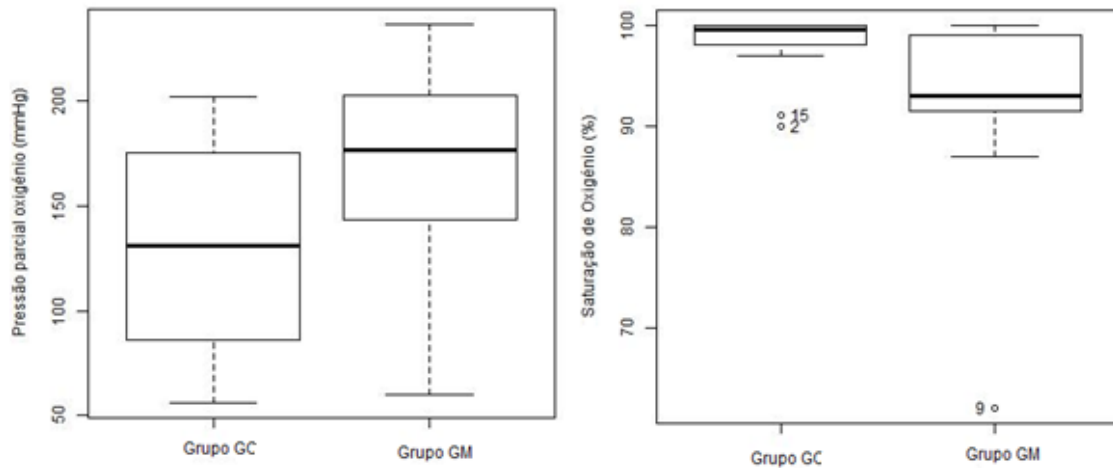


Relativamente aos valores das variáveis em estudo,  $PO_2$  e  $SO_2$ , de ambos os grupo (GC e GM), estes encontram-se descritos na tabela 5.

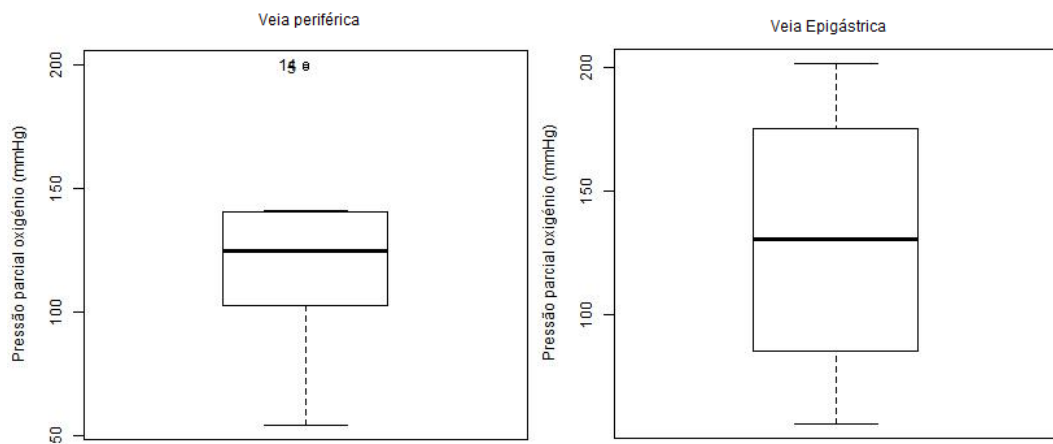
**Tabela 5-**Características amostrais das variáveis  $PO_2$  e  $SO_2$  dos grupos GC e GM

Grupo	Variável	Média	Desvio Padrão	Máximo	Mínimo	Mediana
GC	$PO_2$ Veia safena (mmHg)	125,20	45,40	200,00	54,00	124,70
	$PO_2$ Veia epigástrica (mmHg)	130,100	51,72	202,00	56,00	130,80
	$SO_2$ Veia safena (%)	97,58	3,34	100,00	88,00	99,00
	$SO_2$ Veia epigástrica (%)	97,92	3,56	100,00	90,00	99,50
GM	$PO_2$ Veia safena (mmHg)	122,93	60,11	217,00	31,70	115,10
	$PO_2$ Veia epigástrica (mmHg)	166,50	49,95	237,00	59,8	177,00
	$SO_2$ Veia safena (%)	94,71	7,61	106,00	77,00	98,35
	$SO_2$ Veia epigástrica (%)	92,99	8,36	100,00	62,00	93,00

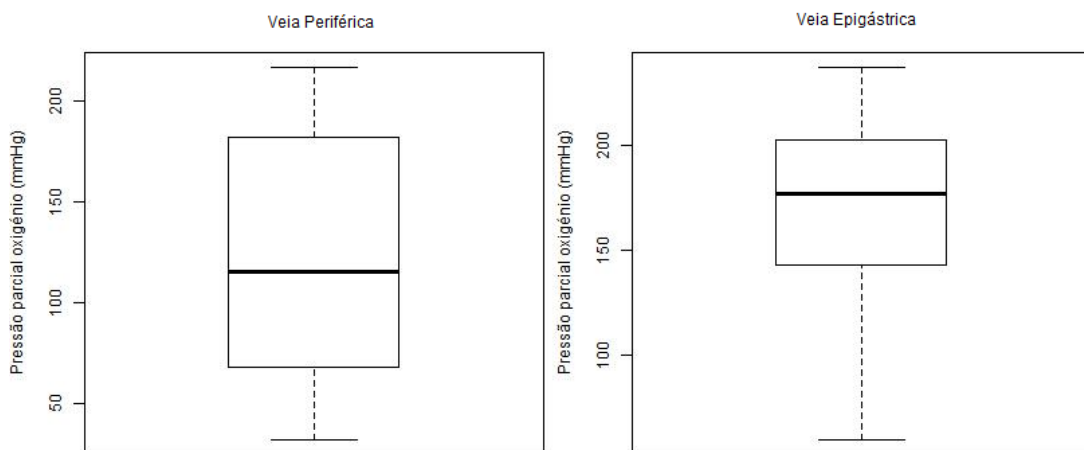
**Figura 8-** *Boxplots* dos valores da variável  $PO_2$  e  $SO_2$  obtidos por colheita de sangue da veia epigástrica, nos dois grupos de estudo



**Figura 9-** *Boxplots* dos valores da variável  $PO_2$ , obtidos por colheita se sangue da veia safena e da veia epigástrica caudal da mama, no grupo GC



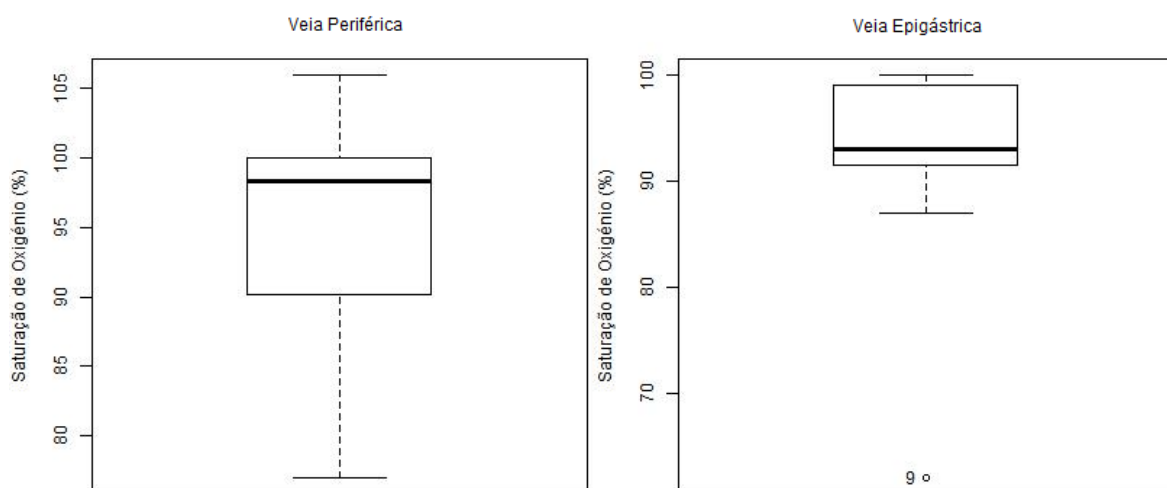
**Figura 10-** *Boxplots* dos valores da variável  $PO_2$ , obtidos por colheita se sangue da veia safena e da veia epigástrica caudal da mama, no grupo GM



**Figura 11-**Boxplots dos valores da variável  $SO_2$ , obtidos por colheita se sangue da veia safena e da veia epigástrica caudal da mama, no grupo GC



**Figura 12-**Boxplot dos valores da variável  $SO_2$ , obtidos por colheita se sangue da veia epigástrica caudal da mama, no grupo GM



Com base no teste de *Shapiro-Wilk*, o pressuposto de normalidade da variável  $PO_2$  foi aceite, quer nos valores obtidos na colheita sanguínea da veia safena ( $p= 0.10$ ) quer nos obtidos na colheita sanguínea da veia epigástrica ( $p= 0,13$ ). Assim sendo, utilizou-se o teste *t student* para amostras independentes, com o objectivo de avaliar se o valor da  $PO_2$  obtido a partir da colheita de sangue da veia epigástrica variava entre os grupos GC e GM. O valor obtido foi de  $p=0,06$  o que permite concluir que a diferença entre grupos não foi estatisticamente significativa.

No caso da variável  $SO_2$ , a normalidade foi rejeitada para os valores obtidos quer na veia safena ( $p= 4.73 \times 10^{-5}$ ) quer na veia epigástrica caudal ( $p= 2.11 \times 10^{-7}$ ). Desse modo utilizou-se o método não paramétrico *Wilcoxon signed-rank test* para avaliar se o valor da  $SO_2$  obtido na colheita de sangue da veia epigástrica caudal variava entre os grupos GC e GM. O valor obtido foi de  $p=0.64$ , permitindo concluir que a diferença entre grupos não foi estatisticamente significativa.

## CAPÍTULO V – DISCUSSÃO DE RESULTADOS

---

De acordo com os resultados obtidos foi possível verificar que a idade média de diagnóstico de tumor mamário foi de 7 anos, o que está de acordo com o estudo de Villalobos & Kaplan,(2007) que refere que o diagnóstico de tumores mamários antes dos 5 anos de idade é uma condição rara.

A maioria dos tumores mamários ocorrem em animais de meia-idade, a literatura refere ainda que o intervalo de idades para o diagnóstico de doença oncológica da mama na cadela é entre os 10 e os 11 anos (Morris & Dobson, 2001), o que está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, já que a média de idades do diagnóstico de tumor mamário foi de aproximadamente 11 anos.

O risco de desenvolvimento de tumores mamários na cadela diminui significativamente quando o animal é sujeito a OVH precocemente, sendo que esse risco varia consoante a OVH seja realizada antes do primeiro, antes do segundo ou até aos 2 anos de idade, apresentando respetivamente os valores de 0,5%, 0,8% e 26% (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012). A partir dos 2 anos de idade já não existe relação entre a realização de OVH e a diminuição da probabilidade de desenvolvimento de tumor mamário (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012). Os resultados obtidos são reflexo disso mesmo já que, apenas 25% das cadelas (n=5) que apresentaram tumores mamários eram esterilizadas e só 10% (n=2) tinham sido submetidas a OVH antes do segundo estro.

Não é simples estabelecer uma predisposição rática para a presença de tumores mamários devido há grande variação de doentes utilizadas na amostra dos diversos estudos (Alenza, Peña, Del Castillo, & Nieto, 2002). No entanto segundo o estudo de Salas et al.,(2015), existe uma maior incidência de tumores mamários em cadelas de raça definida (80%) comparativamente às cadelas sem raça definida (20%). Neste trabalho 55% das cadelas estudadas e que apresentavam tumores mamários eram animais sem raça definida.

Embora seja aceite que a incidência de tumores mamários aumenta em animais sujeitos a terapias com análogos sintéticos da progesterona (Sorenmo, Worley, & Goldschmidt, 2012), no presente estudo não foi possível concluir nada sobre esse assunto já que, nenhuma cadela da amostra foi submetida a esse tipo de terapia hormonal, respeitando assim um dos critérios de inclusão do estudo.

MacPhail, (2013) refere que a incidência de tumores mamários malignos na cadela varia entre 35 a 50% e compara o total de tumores mamários caracterizados histopatologicamente, apresentando um resultado em que 20% eram de origem benigna e

80% de origem maligna, o que também se verificou no presente estudo. Relativamente ao tipo histopatológico, os resultados obtidos mostram uma prevalência dos carcinomas túbulo-papilíferos com um valor de 45% seguido pelos carcinomas sólidos com um valor de 25%, o que não está de acordo com Chun & Garrett, (2010) que descrevem os carcinomas sólidos como o tipo histológico mais comum de tumor mamário na cadela, seguido dos carcinomas túbulo-papilíferos.

Está descrito que na cadela a incidência de tumores múltiplos é maior do que a incidência de tumores únicos, situando-se entre os 50-70% (Misdorp, 2002). Os resultados obtidos no estudo demonstram o mesmo, verificando-se uma percentagem de tumores múltiplos de 60% da amostra.

De acordo com Sorenmo et al., (2012), a maioria dos tumores mamários ocorrem nas mamas abdominais e inguinais, o que está em concordância com os resultados do presente estudo, pois constatou-se que as mamas mais afectadas foram as abdominais com uma incidência total de 53,1%, sendo que 21,85% correspondiam às abdominais craneais e 31,25% às abdominais caudais, seguidas pelas mamas inguinais (37,5%).

No que diz respeito à análise estatística realizada no trabalho, é necessário uma interpretação cuidada dos resultados, pois a dimensão da amostra afeta significativamente o valor de p. Ao referir que algo é estatisticamente significativo, tal pode não corresponder a “significativo” do ponto de vista clínico. Quando se conclui que uma diferença não é significativa, isso não indica propriamente que as médias sejam iguais, ou que não exista um efeito substantivo, significa sim que não houve evidência suficientemente forte para provar que essas diferenças eram significativas. Assim se percebe que o significado clínico deve ser o primeiro a ser considerado e só depois o significado estatístico do resultado obtido na amostra (Loureiro & Henriques Gameiro, 2011).

A tensão de oxigénio ( $PO_2$ ), pode ser descrita de um modo simples como a força que as partículas de oxigénio exercem nas paredes de um recipiente fechado (Yamamoto, 2002). Em física é sabido que os gases deslocam-se rapidamente, pelo que a  $PO_2$  de um gás tende a tornar-se semelhante ao valor de  $PO_2$  de uma amostra que esteja em contacto direto com ele por um período mínimo de 5 segundos. Se considerarmos que a pressão atmosférica ao nível do mar é de 760 mmHg e que o ar atmosférico contém 21% de Oxigénio, é possível concluir que o ar que respiramos tem uma  $PO_2$  de 160 mmHg. Assim, em qualquer líquido que se encontre exposto ao ar a sua  $PO_2$  vai rapidamente equilibrar-se com a do ambiente, ficando o líquido com um valor de  $PO_2$  de 160 mmHg (Yamamoto, 2002).

Ao contrário da  $PO_2$  que pode ser mensurada em qualquer fluído, a  $SO_2$  apenas pode ser medida a partir do sangue. A  $PO_2$  e a  $SO_2$  estão relacionadas entre si através da curva de dissociação da hemoglobina (Yamamoto, 2002). Esta curva é feita tendo no eixo vertical a  $SO_2$  e no eixo horizontal a  $PO_2$ , e através dela é possível verificar que a saturação de oxigénio aumenta enquanto a  $PO_2$  for aumentando até ao ponto em que a  $SO_2$  alcançar os 90-100% (altura em que todos os locais de ligação do oxigénio na hemoglobina já contêm oxigénio) pelo que a partir deste ponto mesmo que a  $PO_2$  continue a aumentar o valor de  $SO_2$  manter-se-á sempre constante, pois a  $SO_2$  não aumenta para além dos 100% (Yamamoto, 2002).

No caso dos doentes estarem sujeitos a suplementação de oxigénio, a  $PO_2$  inspirada aumenta para os 200mmHg, 400mmHg ou até valores mais elevados dependendo da quantidade de  $O_2$  inalado (Yamamoto, 2002). No presente estudo as cadelas encontravam-se conectados a um sistema de administração de anestesia volátil, em circuito semi-fechado (2% isoflurano vaporizado em 1L de 100% oxigénio/minuto), o que justifica o facto de todos os indivíduos da amostra, independentemente do grupo a que pertenciam apresentarem tanto na veia safena como na veia epigástrica, valores de  $PO_2$  superiores ao intervalo de referência.

O oxigénio é transportado no sangue sobre duas formas: 1) dissolvido no plasma e 2) ligado reversivelmente à hemoglobina (proteína que transporta o  $O_2$  no sangue, cada molécula de hemoglobina é capaz de transportar 4 moléculas de  $O_2$ ) (Cunningham & J., 2007).

Na presença de uma  $PO_2$  dentro de valores fisiológicos, apenas uma pequena parte de oxigénio está dissolvido no plasma, já que o oxigénio apresenta uma baixa solubilidade na água. Na presença de valores de  $PO_2$  elevados, a percentagem de oxigénio dissolvido no plasma torna-se significativa, a lei de Henry mostra que a quantidade de  $O_2$  dissolvido no plasma é diretamente proporcional ao valor  $PO_2$  (Pittman, 2001):

$$[O_2] = \alpha PO_2$$

$$\alpha = 0.003 \text{ ml } O_2 (100 \text{ ml plasma})^{-1} \text{ mm Hg}^{-1} \text{ (Pittman, 2001)}$$

São vários os métodos que existem para deteção de hipóxia tumoral. Para escolher o método a utilizar deve-se ter em conta os seguintes factores: 1) a viabilidade das abordagens disponíveis, 2) o grau de resolução necessária, 3) a invasão do método, 4) as considerações financeiras (Stone, Brown, Philips, & Sutherland, 1992). Neste estudo optou-se pela utilização do aparelho portátil i-STAT®, com o respetivo perfil analítico CG4+, que está indicado para a realização da análise dos gases sanguíneos, tem a vantagem de ser móvel, de fácil utilização e estar disponível nos locais onde foram recolhidas as amostras .

O estudo utilizou amostras de sangue venoso, as quais foram analisadas imediatamente após a colheita, uma vez que o valor de PO<sub>2</sub> pode ser alterado pelo contacto prolongado com o ar ambiente (Pittman, 2001).

Embora esteja descrito que a análise de sangue arterial é o padrão e o ideal para a realização da gasometria sanguínea, neste estudo utilizou-se sangue venoso, já que a sua colheita é menos dolorosa e mais fácil de realizar em comparação com a colheita arterial (Shirani, Salehi, Naina, & Gholmrezaei, 2011). Tendo em conta o objectivo deste trabalho, considerou-se que a determinação dos valores PO<sub>2</sub> a partir sangue venoso seria o mais indicado, uma vez que estes valores são determinados pelo balanço entre a quantidade total de oxigénio fornecido e o consumo de oxigénio pelos tecidos, sendo assim possível avaliar o metabolismo tecidual e o consumo de oxigénio pelos tecidos (Hopper, 2005).

No grupo GC tanto os valores das médias como os do desvio-padrão, obtidos por colheita na veia safena ( $\bar{x}=97,58\%$ ;  $\sigma=3,34$ ) e na veia epigástrica ( $\bar{x}=97,92\%$ ;  $\sigma=3,56$ ) foram muito semelhantes (Tabela 5). Já no grupo GM embora apresentem valores similares é possível verificar uma pequena diferença entre os valores das médias bem como do desvio-padrão, obtidos por colheita na veia safena ( $\bar{x}=94,71\%$ ;  $\sigma=7,61$ ) e na veia epigástrica ( $\bar{x}=92,99\%$ ;  $\sigma=8,36$ ), verificando-se que neste grupo, a média dos valores de SO<sub>2</sub> é ligeiramente menor na veia epigástrica (Tabela 5).

Com a análise descritiva do parâmetro SO<sub>2</sub>, foi possível constatar que a média do valor deste parâmetro foi sempre superior a 90 mmHg, independentemente do grupo e da veia em que a amostra foi colhida (Figuras 11 e 12). Este resultado está de acordo com o que seria espectável segundo a literatura, já que os animais se encontravam todos com suplementação de oxigénio (Yamamoto, 2002). Não foi possível estabelecer uma correlação estatisticamente significativa para os valores obtidos entre os grupos GC e o GM relativamente ao valor de SO<sub>2</sub> da veia epigástrica, uma vez que o valor- $p > 0,05$ .

Relativamente à PO<sub>2</sub>, em ambos os grupos os valores de PO<sub>2</sub> registados na veia epigástrica foram superiores aos da veia safena (Figuras 9 e 10). Embora não se encontre uma razão clara para tal acontecimento, este pode relacionar-se com o facto de a recolha de sangue na veia epigástrica não ser realizada no exato momento da recolha de sangue na veia safena. Este atraso da recolha da amostra sanguínea na veia epigástrica, prende-se com o facto deste procedimento ser de execução mais difícil e demorado do que a punção da veia safena. Assim se percebe que no grupo GM a média de valores da PO<sub>2</sub> da veia epigástrica seja um pouco superior á média do grupo GC (Figura 8), já que na mastectomia a recolha de sangue foi efectuada aquando o rebatimento da cadeia mamária, o que acarreta um tempo de espera maior até à realização da colheita sanguínea. Adicionalmente, algumas

das fêmeas do grupo GM realizaram no mesmo tempo cirúrgico uma OVH antes da exérese da cadeia mamária. Neste tempo de espera até à punção da veia epigástrica, a doente continua a inalar oxigénio a uma concentração superior à do ar atmosférico, aumentando assim a  $PO_2$  do sangue. Comparando o valor da  $PO_2$  referente à colheita da veia safena entre os dois grupos, verificou-se que embora ambos apresentem valores muito próximos de  $\bar{x}=125,20$  mmHg para o grupo GC e de  $\bar{x}=122,93$  mmHg para o grupo GM, o desvio padrão do grupo GM ( $\sigma=60,11$ ) foi superior ao do grupo GC ( $\sigma=45,40$ ), o que indica que os dados do grupo GM estão dispersos por uma maior gama de valores.

A comparação dos valores de  $PO_2$  da veia epigástrica entre os dois grupos, permitiu verificar que não existe uma correlação estatisticamente significativa entre os valores obtidos de variação de  $PO_2$  com a presença de tumor de mama, o que não está de acordo com a pouca literatura existente sobre o assunto (Vaupel, Schlenger, Knoop, & Hockel, 1991; Hohenberger, Felgner, Haensch, & Schlag, 1998). Existem alguns factores que podem ajudar a perceber a razão pela qual esta relação não ter sido comprovada com o presente estudo, nomeadamente, a utilização de uma amostra de pequena dimensões à qual de associou uma variação considerável nos tipos histológicos de tumor. Tendo em conta que nos tumores o elevado ritmo de proliferação celular leva a que as novas células formadas empurrem as existentes para a periferia, expondo-as assim gradualmente a uma menor quantidade de nutrientes e oxigénio, esse fornecimento inadequado de oxigénio irá originar hipoxia ou mesmo de anóxia a nível celular (Hocke & Vaupel, 2001). Estas micro-regiões de pressões parciais de  $O_2$  muito baixas ou mesmo nulas, estão distribuídas heterogeneamente dentro da massa tumoral e podem estar localizadas adjacentes a regiões com pressões parciais de  $O_2$  normais (Hocke & Vaupel, 2001). Assim se entende que as medições a nível sanguíneo acabam por não conseguir refletir as variações existentes na pressão parcial de  $O_2$  no tumor, razão pela qual, se utilizam atualmente métodos indiretos de imunohistoquímica para deteção da hipóxia tumoral (Le & Courter, 2008). Contudo a impossibilidade de acesso a esta técnica e a falta de verbas para a sua realização constituiu um impedimento à sua escolha como método de determinação dos níveis de hipoxia tumoral.

É também aceite que, os tumores de tipos e em estádios semelhantes podem diferir na fração de células que se encontram em situação de hipoxia (Hockel & Vaupel, 2016), pelo que esta característica tumoral constituiu também uma condicionante que deve ser considerada.

O conjunto das limitações referidas, terá contribuído para que os valores obtidos neste estudo não apresentassem um nível de significância com valor estatístico aceitável, as quais devem ser consideradas durante a interpretação e avaliação dos resultados obtidos.

## CAPÍTULO VI- CONCLUSÃO

---

Relativamente ao objectivo do presente estudo, embora tenha sido possível quantificar o valor de PO<sub>2</sub> em cadelas submetidas a mastectomia por presença de doença oncológica, não foi possível provar a existência de uma diferença estatisticamente significativa entre os valores da PO<sub>2</sub> entre os doentes oncológicas vs saudáveis. Factores como: 1) o reduzido tamanho da amostra, 2) as limitações financeiras e de acesso a métodos de imunohistoquímica para avaliação da hipóxia tumoral, foram os principais factores que concorreram para os resultados obtidos.

O tema do trabalho constitui um assunto novo e de grande interesse para a oncologia Humana e Veterinária, na medida em que se torna cada vez mais importante perceber o grau de hipóxia tumoral, já que está estabelecida uma relação do tipo causa-efeito entre a hipóxia e a fraca resposta dos doentes a certo tipo de terapêuticas anticancerígenas. Esta é pois uma área de investigação de excelência onde, de acordo com os trabalhos publicados o acesso a métodos de coloração imunohistoquímica se tem revelado como o método mais adequado para a deteção das áreas de hipóxia do tecido tumoral. São vários os marcadores que podem ser utilizados para avaliar a hipóxia tecidual, contudo, nenhum deles por si só tem a capacidade de captar todas as complexidades da hipóxia tumoral e sua heterogeneidade. Em teoria, uma combinação de marcadores seria uma maneira mais robusta de avaliação da hipóxia tumoral do que apenas um único marcador.

Seria interessante a realização de mais trabalhos que comprovem e comparem a extensão da hipóxia tumoral com a classificação molecular dos tumores mamários e possível envolvimento dos linfonodos regionais, incidindo principalmente no seu real valor de prognóstico.

## CAPITULO VII – BIBLIOGRAFIA

---

Abbott. (Outubro de 2016). *i-stat produtos*. Obtido de <http://www.cnph.com.br/produtos/Tabela%20i-STAT.asp>

Abbott. (2013). *i-STAT®1 System Manual*.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.

Alenza, M. D., Peña, L. .., Del Castillo, N., & Nieto, A. I. (2002). Factors influencing the incidence and prognosis of canine tumours. *Journal of Small Animal Practice* , 41.287-291.

Andrade, F. H., Figueiroa, F. C., Bissacot, D. Z., & Rocha, N. S. (2010). Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. *Diagnostic Pathology* , 5:45.

Argyle, D. J., & Khanna, C. (2013). Tumor Biology and Metastasis. In S. J. Withrow, & D. M. Vail, *Small Animal Clinical Oncology* (pp. 30-52). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.

Arvelo, F., & Cotte, C. (2009). Hipoxia en la malignidad del cáncer. *Invest Clin* , 50(4): 529 - 546.

Beha, G. B. (2012). Molecular portrait-based correlation between primary canine mammary tumor and its lymph node metastasis: possible prognostic-predictive models and/or stronghold for specific treatments? *BMC Veterinary Research*, 8, 219 .

Beha, G. M. (2014). Molecular phenotype of primary mammary tumours and distant metastases in female dogs and cats . *Journal of Comparative Pathology* , 150, 194-197.

Bistner, S. I., Ford, R. B., & Raffe, M. R. (2000). Emergency Care. In S. I. Bistner, R. B. Ford, & M. R. Raffe, *Handbook of Veterinary Procedures and Emergency Treatment*. HB Saunders Company.

Button, V. L. (2015). *Principles and Measurement and Transduction of Biomedical Variables*. Elsevier.

Chun, R., & Garrett, L. D. (2010). Urogenital and Mammary Gland Tumors. In S. J. Ettinger, & E. C. Feldman, *TEXTBOOK OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE (SEVENTH EDITION ed., Vol. 1, pp. 2211-2213)*. St. Louis, Missouri: SAUNDERS Elsevier.

Cleary, M., Grossmann, M., & Ray, A. (2010). Effect of obesity on breast cancer development. *Veterinary Pathology* , 47(2), 202-213.

Cullen, J. M., Page, R., & Misdorp, .. (2002). Cancer Pathogenesis, Diagnosis, and Management. In J. M. Cullen, R. Page, .. Misdorp, & D. J. Meuten (Ed.), *Tumors in Domestic Animals* (Fourth Edition ed., pp. 3-45). Ames, Iowa: Iowa State Press.

Cunningham, G., & J., K. G. (2007). *Textbook of Veterinary Physiology*. Saunders Elsevier.

De Oliveira, L. O., & R. T., L. A. (2003). Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae* . , 31(2): 105- 110,.

DOBSON, J. M., MILSTEIN, H., ROGERS, K., & Wood, J. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice* , 43, 240–246.

- Doré, M., Lanthier, I., & Sirois, J. (2003). Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology* , 40:207-212.
- Eroles, P. B.-F. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*, 38(6), 698-707 .
- Euler, H. v. (2011). Tumours of the mammary gland. In J. Dobson, & B. D. Lascelles, *Oncology, BSAVA Manual of Canine and Feline* (third edition ed., pp. 237-246). British Small Animal Veterinary Association.
- Fossum, T. W., Hedlund, C., Johnson, A., Schulz, K., Seim, H., Willard, M., et al. (2007). *Small Animal Surgery* (Third edition ed.). St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier.
- Gama, A. A. (2008). Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch* .
- Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., & Zappulli, V. (2011). Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology* , 48(1) 117-131.
- Grosenbaugh, D. A., Gadawski, J. E., & Muir, W. W. (1998). Evaluation of a portable clinical analyzer in a veterinary hospital setting. *Journal of the American Veterinary Medical Association* , 213 (5), 691–694.
- Gupta, K., Sood, N. K., Uppal, S. K., Mohindroo, J., Mahajan, S., Raghunath, M., et al. (2012). Epidemiological Studies and its Relevance for Breast Cancer Studies. *IOSR Journal of Pharmacy* , 2, 322-333.
- Hammond, R., & Walters, C. (1999). Monitoring the Critical Patient. In R. Hammond, & Walters, *Manual of Canine and Feline Emergency and Critical Care*. BSAVA.
- Harvey, H. J., & Miller, J. M. (2014). Mammary glands. In M. J. Bojrab, D. R. Waldron, & J. P. Toombs, *Current Techniques in Small Animal Surgery* (pp. 590–594). Jackson, Wyoming, USA: Teton NewMedia.
- Heller, D., Clifford, C., Goldschmidt, M., Holt, D., Shofer, F., Smith, A., et al. (2005). Cyclooxygenase-2 Expression is Associated with Histologic Tumor Type in Canine Mammary Carcinoma. *Veterinary Pathology* , 42:776-780.
- HENRY, C. J. (2014). Mammary Cancer. In C. J. HENRY, J. D. Bonagura, & D. C. Twedt (Edits.), *KIRK'S CURRENT VETERINARY THERAPY XV* (pp. 375-380). St. Louis, Missouri: ELSEVIER.
- Hocke, M. I., & Vaupel, P. (2001). Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *Journal of the National Cancer Institute* , Vol. 93, No. 4.
- Hockel, M., & Vaupel, P. (2016). Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *JNCl: Jnl of National Cancer Institute* , 266-276.
- Hohenberger, P., Felgner, C., Haensch, W., & Schlag, P. M. (1998). Tumor oxygenation correlates with molecular growth determinants in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* , 48: 97–106.

- Hopper, K. (2005). *Assessment of Oxygenation*. Rimini, Italia: 50° Congresso Nazionale Multisala SCIVAC.
- Hyttel, P. S., & Vejlested, M. (2010). *Essentials of Domestic Animal Embryology*. Elsevier Limited.
- Irizarry, R., & Reiss, A. (2009). Arterial and venous blood gases: indications, interpretations, and clinical applications. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarians* , 1-7.
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2008). Aparelho reprodutor feminino. In L. C. Junqueira, & J. Carneiro, *Histologia Básica* (pp. 448-452). Guanabara Koogan.
- Kim, J. I. (2011). Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors: histopathological and immunohistochemical study. *Veterinary Journal* .
- Klopfleisch, R., & Gruber, A. (2009). Increased Expression of BRCA2 and RAD51 in Lymph Node Metastases of Canine Mammary Adenocarcinomas. *Veterinary Pathology* , 46:416–422.
- Kotanen, C. N., & Guiseppi-Elie, A. (2013). Monitoring systems and quantitative measurement of biomolecules for the management of trauma. *Biomedical Microdevices* , 15 (3), 561–577.
- Kumaraguruparan, R., Prathiba, D., & Nagini, S. (2006). Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Research in Veterinary Science* 81 , 218–224.
- Kusewitt, D., & Rush, L. (2007). Neoplasia and tumor biology. In D. Kusewitt, L. Rush, M. McGavin, & J. Zachary (Edits.), *Pathologic basis of veterinary disease*. (Fourth ed., pp. 253-298). Missouri: Mosby Elsevier.
- Lana, S., Rutteman, G., & Withrow, S. (2007). Tumors of the mammary gland. In S. Withrow, D. Vail, & W. & MacEwen's, *Small Animal Clinical Oncology* (pp. 619-636). Saunders Elsevier.
- Lapa, P., Jacobetty, M., Teixeira, T., Silva, R., Saraiva, T., Ferreira, R., et al. (2015). Avaliação de hipóxia tumoral por pet/ct com fluoromisonidazol (18 f) no planejamento em radioterapia. Experiência inicial. *ACTA RADIOLÓGICA PORTUGUESA* , nº106, Volume XXVII , 59-65.
- Le, Q.-T., & Courter, D. (2008 ). Clinical Biomarkers for Hypoxia Targeting. *Cancer Metastasis Rev.* , 27(3): 351–362.
- ŁOPUSZYŃSKI, W., SZCZUBIAŁ, M., & KOMSTA, R. (2010). Prognostic status of p53 protein accumulation in canine malignant mammary tumours. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* , 54, 105-111.
- Loureiro, L. M., & Henriques Gameiro, M. (2011). Interpretação crítica dos resultados estatísticos: para lá da significância estatística. *Revista de Enfermagem Referência* , 151-162.
- MacPhail, C. M. (2013). Surgery of the reproductive and genital systems. In T. Fossum, *Small Animal Surgery* (pp. 780–855). Mosby, Elsevier.
- Millanta, F., Citi, S., Della, S. D., Porciani, M., & Poli, A. (2006). COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research and Treatment* , 98:115-120.

- Misdorp, W. (2002). Tumors of the Mammary Gland. In D. J. Meuten, *TUMORS in Domestic Animals* (Fourth Edition ed., pp. 575-604). Iowa State Press.
- Misdorp, W., Else, R., Hellmén, E., & Lipscomb, T. (1999). *Histological Classification of Mammary Tumours of the Dog and the Cat*. Washington D.C.: Series Editor.
- Morris, J., & Dobson, J. (2001). *Small Animal Oncology*. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- MUTO, T., WAKUI, S., TAKAHASHI, H., MAEKAWA, S., MASAOKA, T., USHIGOME, S., et al. (2000). p53 Gene Mutations Occurring in Spontaneous Benign and Malignant Mammary Tumors of the Dog. *Veterinary Pathology* , 37, 248–253.
- Muz, B. D. (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Dovepress Journal* .
- Muz, B., De la Puente, P., Azab, F., & Azab, A. (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Dovepress Journal* .
- Oliveira, R., & Ricardo, A. (2002). Agentes Antineoplásicos Biorredutíveis: Uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. *Quim. Nova* , Vol.25, No.6, 976-984.
- Peiró, J. R., Borges, A. S., Gonçalves, R. C., & Mendes, L. C. (2002). Evaluation of a portable clinical analyzer for the determination of blood gas partial pressures, electrolyte concentrations, and hematocrit in venous blood samples collected from cattle, horses, and sheep. *American Journal of Veterinary Research* , 71 (5), 1–7.
- Peleteiro, M. (1994). Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* , LXXXIX(509),10-34.
- Peleteiro, M., & Correia, J. (1993). Classificação TNM dos tumores mamários de cadela e gata. *Medicina Veterinária* , 44, 47-50.
- Pittman, R. N. (2001). Oxygen Transport. In R. N. Pittman, *Regulation of Tissue Oxygenation* (p. Chapter 4). Morgan & Claypool Publishers.
- Queiroga, F., & Lopes, C. (2002). Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* , 97 (543), 119-127.
- Queiroga, F., Alves, A., Pires, I., & Lopes, C. (2007). Expression of Cox-1 and Cox-2 in Canine Mammary Tumours. *Journal of Comparative Pathology* , 136:177-185.
- Queiroga, F., Pérez-Alenza, M., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C., & Illera, J. (2005). Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* , 94, 181-187.
- Queiroga, F., Pires, I., Parente, M., Gregorio, H., & Lopes, C. (2011). COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. *The Veterinary Journal* , 189:77-82.
- Radostits, O., Mayhew, I. G., & Houston, M. D. (2002). *Examen y Diagnostico Clinico-Otto Radostits*. Elsevier Science.

- Reece, W. O., Erickson, H. H., Goff, J. P., & Uemura, E. E. (2015). *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. Wiley.
- Rodriguez, M. (2016). Breast Cancer Awareness: Canine Version. *Route 516 Animal Hospital* .
- Ruiz, F. B. (1999). Función pulmonar y su evaluación. In F. B. Ruiz, *Principios de urgencias, emergencias y cuidados criticos* (p. Capítulo 2. 1.). S.L.Alhulia.
- Rutteman, G. R., & Kirpensteijn, J. (2003). Tumours of the mammary glands. In J. D. Lascelles, *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (pp. 234-242). British Small Animal Veterinary Association.
- Salas, Y., Márquez, A., Diaz, D., & Romero, L. (2015). Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. *PLOS ONE* , 15.
- Sartin, E., Barnes, S., Toivio-Kinnucan, M., & Wright, J. (1993). Heterogenic properties of clonal cell lines derived from canine mammary carcinomas sensitivity to tamoxifen and doxorubicin. *Anticancer Research* , 13,229-236.
- Sassi, F. B. (2010). Molecular-based tumour subtype of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Veterinary Research* .
- Shirani, F., Salehi, R., Naina, A., & Gholmrezaei, A. (2011). The effects of hypotension on differences between the results of simultaneous venous and arterial blood gas analysis. *Journal of Research in Medical Sciences* , 16: 188-94 .
- Silva, J. A. (1984). *Fornecimento e consumo de oxigénio pelos tecidos em geral*. (F. d. Lisboa, Ed.) Obtido em Janeiro de 2016, de Bioquímica da Isquémia: [http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/1123/9/17186\\_Bioquimica\\_da\\_isqu00E9mia-1984.pdf](http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/1123/9/17186_Bioquimica_da_isqu00E9mia-1984.pdf)
- Silver, I. (1966). The anatomy of the mammary gland of the dog and cat. *Journal of Small Animal Practice* , 689-696.
- Sontas, B., Ozyogurtcu, H., Gurel, A., & Ekici, H. (2009). Evaluation of clinical and pathological characteristics of 155 canines with mammary tumours: a retrospective study. *CANINE, MAMMARY NEOPLASIA, HISTOPATHOLOGY* , Arch Med Vet .
- Sorenmo, K. U., Worley, D. R., & Goldschmidt, M. H. (2012). Tumors of the Mammary Gland. In S. Withrow, D. Vail, & P. Rodney, *Small Animal Clinical Oncology* (5 edition ed., pp. 538-551). Saunders.
- Stone, H., Brown, J., Philips, T., & Sutherland, R. (1992). Oxygen in human tumors: correlations between methods of measurement and response to therapy. *Radiat Res* , 422.
- Tavasoly, A., Golshahi, H., Rezaie, A., & Farhadi, M. (2013). Classification and grading of canine malignant mammary tumors. *Veterinary Research Forum* , 4(1): 25–30.
- Vaupel, P. (2004). The Role of Hypoxia-Induced Factors in Tumor Progression. *The Oncologist* , (suppl 5):10-17.
- Vaupel, P., & Harrison, L. (2004). Tumor Hypoxia: Causative Factors, Compensatory Mechanisms, and Cellular Response. *The Oncologist* , (suppl 5):4-9.

Vaupel, P., Schlenger, K., Knoop, C., & Hockel, M. (1991). Oxygenation of Human Tumors: Evaluation of Tissue Oxygen Distribution in Breast Cancers by Computerized O<sub>2</sub> Tension Measurements. *Cancer Research* , 51. 3316-3322.

Verwaerde, P. M., Lagente, M., Farge, d. L., F., & B., & P., J. (2002). The accuracy of the i-STAT portable analyser for measuring blood gases and pH in whole-blood samples from dogs. *Research in Veterinary Science* , 73 (1), 71–75.

Villalobos, A., & Kaplan, L. (2007). *Canine and Feline Geriatric Oncology: Honoring the Human-Animal Bond* (First edition ed.). Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing.

VSSO. (Junho de 2016). *Veterinary Society of Surgical Oncology*. Obtido de Canine mammary tumors: <http://www.vssso.org/index.php/education-new/cancer-information-new/cancer-in-dogs-by-tumor-type-new/9-education/347-mammary-tumors-canine>

Waddel, L. S. (2012). Blood Gas Analysis. *NAVC Clinician's Brief* .

Yamamoto, L. G. (2002). Interpretation of Blood Gases and Pulse Oximetry . *Case Based Pediatrics For Medical Students and Residents, Department of Pediatrics, University of Hawaii John A. Burns School of Medicine* .

Zhang, W., Shi, X., Peng, Y., Wu, M., Zhang, P., Xie, R., et al. (2015). HIF-1 $\alpha$  Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis through Direct Regulation of ZEB1 in Colorectal Cancer. *PLOS ONE* .

Zuccari, D., Castro, R., Gavioli, A., Mancini, U., Frade, C., & C., L. (2012). Immunohistochemical and molecular analysis of caveolin-1 expression in canine mammary tumor. *Genetic and Molecular Research* , 11:153-165.

## ANEXOS

### Anexo I

**Quadro 1-** Classificação e breve caracterização histológica de tumores mamários malignos da espécie canina (adaptado de Misdorp et al. 1999)

<b>Tumores Malignos</b>		
<b>Carcinoma in situ</b>	Neoplasia constituída por nódulos bem demarcados de tecido neoplásico, com características histológicas de malignidade mas que ainda não invadiu a membrana basal.	
<b>Carcinoma complexo</b>	É constituído por células epiteliais lumbais e mioepiteliais, as células epiteliais lumbais organizam-se num padrão túbulo-papilífero ou sólido, já as células mioepiteliais, distribuem-se segundo um padrão reticulado. Embora geralmente apresentem um crescimento infiltrativo, têm um baixo grau de invasão dos vasos linfáticos (ocorre em apenas 10% casos).	
<b>Carcinoma simples</b>	É o tipo de tumor maligno mais comum nos canídeos. Caracteriza-se por ser composto por apenas um tipo de células, estas podem ser do tipo epitelial luminal ou mioepitelial. Este tipo de tumores são geralmente infiltrativos, em 50% dos casos invadem os vasos sanguíneos e linfáticos. Com base na diferenciação e no comportamento biológico, este tipo de tumor é ainda sub-dividido em três tipos, aqui ordenados pelo seu grau crescente de malignidade:	
	<b>Carcinoma Túbulo-papilífero</b>	Também designado por adenocarcinoma, é um carcinoma que envolve a formação de túbulos com ou sem projecções papilíferas. Ocorre frequentemente nos canídeos e felídeos.
	<b>Carcinoma Sólido</b>	É caracterizado pelas suas células apresentarem uma disposição em lençol, cordões ou ninhos. É comum nos canídeos e felídeos.
<b>Carcinoma Anaplásico</b>	Tem um comportamento altamente infiltrativo e difuso. É constituído por células epiteliais de grandes dimensões, dispostas de forma isolada ou em grupo, pleomórficas, por vezes multinucleadas e, frequentemente, com núcleos bizarros ricos em cromatina. Pode ainda apresentar na sua constituição neutrófilos e eosinófilos. É relativamente comum em canídeos e apresenta uma grande tendência para recidivar e metastizar.	
<b>Carcinomas de tipos especiais</b>	<b>Carcinoma de Células Fusiformes</b>	É relativamente raro nos canídeos. É formado por células fusiformes organizadas num padrão epitelial sólido, embora alguns possam apresentar túbulos. Pensa-se que alguns tumores deste tipo terão origem mioepitelial.

	<b>Carcinoma de Células Escamosas</b>	Tem um crescimento altamente infiltrativo e geralmente invade a circulação linfática. Apresenta na sua constituição cordões clulares sólidos com zonas de cornificação. O núcleo do tumor é composto por queratina lamelar com células tumorais necrosadas, por sua vez, a periferia é formada por células basalóides. É pouco frequente nos canídeos.
	<b>Carcinoma Mucinoso</b>	Caracteriza-se por uma elevada produção de mucina, podendo ter características do tipo simples ou complexo. Ocorrem raramente em canídeos.
	<b>Carcinoma Rico em Lípidos</b>	É constituído por células arredondadas, de citoplasma abundante e grandes vacúolos, contendo grande quantidade de lípidos neutros. É extremamente rara em canídeo.
<b>Sarcomas</b>	<b>Fibrosarcomas</b>	É caracterizado pela proliferação de fibroblastos e pela presença de fibras de reticulina e colagénio.
	<b>Osteosarcomas</b>	Caracteriza-se por uma produção osteóide pelas células neoplásicas. Esta categoria engloba os osteosarcomas puros e os constituídos por combinações de tecido ósseo, fibroso e cartilágneo.
	<b>Outros sarcomas</b>	Fazem parte os condrossarcomas e lipossarcomas, ambos são raros nos canídeos.
<b>Carcinosarcoma</b>	Formado por células morfológicamente semelhantes às células epiteliais malignas (luminais e/ou mioepiteliais) e ao tecido conjuntivo. Após exérese cirúrgica, o tempo de sobrevida é relativamente longo (cerca de 18 meses). As metástases podem ser do tipo carcinomatoso, sarcomatoso ou misto. É pouco comum em canídeos.	
<b>Carcinoma ou Sarcoma em tumores benignos</b>	Apresenta focos de células atípicas com características malignas, em tumores mistos benignos ou em adenomas complexos. A componente maligna pode surgir associado ao tumor benigno ou invadi-lo posteriormente.	

**Quadro 2-** Classificação e breve caracterização histológica de tumores mamários benignos da espécie canina (adaptado de Misdorp et al. 1999)

### Tumores Benignos

<b>Adenoma</b>	<b>Simples</b>	É formado por lesões nodulares, bem delimitadas, constituídas por células mioepiteliais ou epiteliais luminais. Podem também existir mioepiteliomas, com padrão sólido, constituídos por células fusiformes benignas. Os adenomas simples são raros em canídeos.
	<b>Complexo</b>	Constituído por células epiteliais luminais e por células morfológicamente semelhantes a mioepiteliais. Caracteriza-se por ter cápsula e apresentar um baixo índice mitótico, bem como ausência de necrose e de células atípicas. É mais comum na cadela do que na gata.
	<b>Basalóide</b>	É constituído por cordões de células epiteliais monomórficas, que podem estar cornificadas. Distingue-se do adenoma simples pelas células em palissada sobre uma fina membrana basal, que se encontram na periferia.
<b>Fibroadenoma</b>	Consiste numa mistura de células epiteliais luminais e do estroma, e por vezes de células mioepiteliais. Pode estar presente uma elevada percentagem de células em mitose. É relativamente comum nos canídeos.	
<b>Tumor benigno misto</b>	É o resultado da proliferação de células epiteliais luminais e mioepiteliais, ainda células mesenquimatosas capazes de produzir de tecido cartilágneo e osso, tecido adiposo e fibroso. É relativamente frequente em cadelas.	
<b>Papiloma ductal</b>	Tem a sua localização no interior de um ducto distendido, pode ter lóbulos ou ramificações. É raro em cadelas.	

**Quadro 3-** Classificação de lesões não neoplásicas da espécie canina (adaptado de Misdorp et al. 1999)

### Hiperplasias/Displasias (Lesões não neoplásicas)

<b>Hiperplasia Ductal</b>	Consiste na proliferação intraductal de células epiteliais normais ou atípicas, podendo levar a uma obstrução total ou parcial do ducto. Podem ser difusas ou multifocais, no caso de o grau de atipia ser elevado, a lesão passa a ser designada como hiperplasia ductal atípica.
<b>Hiperplasia Lobular</b>	Pode ser de dois tipos: adenose ou epitelióse Na adenose há um aumento do número de ductos e ácinos por lóbulo. A epitelióse consiste na proliferação de células epiteliais nos ductos intralobulares.
<b>Quistos</b>	São geralmente lesões múltiplas que podem atingir dimensões consideráveis.
<b>Ectasia Ductal</b>	Resulta da dilatação progressiva dos ductos, (pode ser secundárias à obstrução luminal) com acúmulo de secreção lipídica.
<b>Fibrose Focal</b>	Também conhecida por fibroesclerose, pode aparecer em qualquer tipo de displasia, no entanto é mais frequente estar associada à hiperplasia lobular ou ductal.
<b>Ginecomastia</b>	Está associada a Sertolinomas, e consiste no aumento da glândula mamária em cães machos, devido a hiperplasia ductal e do estroma, pode afectar mais do que uma glândula.

**Anexo II-** Estatística descritiva da casuística relativa ao período de estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, que teve lugar no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (HE-FMV), entre os meses de Setembro de 2015 e Março de 2016.

**Tabela 6-** Frequências relativas (%) referentes aos casos clínicos acompanhados no HE-FMV, nas áreas de Medicina Preventiva, Patologia Cirúrgica e Patologia Médica.

Áreas	FR(%)	Canídeos (FR(%))	Felídeos (FR(%))	Exóticos (FR(%))
Medicina Preventiva	12,97	75,26	24,74	0,00
Patologia Cirúrgica	27,41	81,46	18,54	0,00
Patologia Médica	59,63	63,90	28,92	7,17

**Tabela 7-** Frequências relativas (%) referentes aos casos clínicos acompanhados no HE-FMV, na área de Medicina Preventiva.

Áreas	FR(%)	Canídeos (FR(%))	Felídeos (FR(%))
Vacinação	84,54	70,73	29,27
Identificação electrónica	15,46	100,00	0,00

**Tabela 8-** Frequências relativas (%) referentes aos casos clínicos acompanhados no HE-FMV, na área de Patologia Cirúrgica.

Áreas	FR(%)	Canídeos (FR(%))	Felídeos (FR(%))
Cirurgia Geral	52,68	80,56	19,44
Pequena Cirurgia	9,76	75,00	25,00
Cirurgia oftálmica	5,85	83,33	16,67
Cirurgia Ortopédica e Trauma	24,39	80,00	20,00
Neurocirurgia	7,32	100,00	0,00

**Tabela 9-** Frequências relativas (%) referentes aos casos clínicos acompanhados no HE-FMV, nas várias áreas de Patologia Médica.

Áreas	FR(%)	Canídeos (FR(%))	Felídeos (FR(%))	Exóticos (FR(%))
Cardiologia e sistema cardiovascular	4,48	65,00	35,00	0,00
Dermatologia	13,45	56,67	15,00	28,33
Doenças Infecciosas	9,42	78,57	21,43	0,00
Endocrinologia	5,83	30,77	69,23	0,00
Gastroenterologia	10,54	44,68	23,40	31,91
Neurologia	5,16	95,65	4,35	0,00
Oftalmologia	6,50	93,10	6,90	0,00
Oncologia	15,47	65,22	34,78	0,00
Ortopedia e traumatologia	11,21	90,00	10,00	0,00
Otorrinolaringologia	3,14	71,43	28,57	0,00
Pneumologia	1,57	57,14	42,86	0,00
Teriogenologia	5,38	75,00	25,00	0,00
Urologia e nefrologia	7,85	14,29	85,71	0,00

**Tabela 10-** Frequências relativas (%) referentes aos casos clínicos acompanhados na HE-FMV, nas áreas de Imagiologia.

<b>Áreas</b>	<b>FR(%)</b>	<b>Canídeos (FR(%))</b>	<b>Felídeos (FR(%))</b>
<b>Ecografia</b>	13,00	45,33	54,67
<b>Radiografia Digital</b>	67,75	72,00	28,00
<b>Tomografia Computarizada</b>	19,25	65,10	34,90