

I

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**MESTRADO**

**EFEITO DE DOSES BAIXAS DE NALTREXONA SOBRE A QUALIDADE DE  
VIDA E SOBREVIDA DE CADELAS COM CARCINOMA MAMÁRIO  
SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM CARBOPLATINA**

**MARÍLIA CARNEIRO DE ARAÚJO MACHADO**

**SALVADOR – BAHIA  
MARÇO/2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS**  
**TRÓPICOS**

**EFEITO DE DOSES BAIXAS DE NALTREXONA SOBRE A QUALIDADE DE**  
**VIDA E SOBREVIDA DE CADELAS COM CARCINOMA MAMÁRIO**  
**SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM CARBOPLATINA**

**MARÍLIA CARNEIRO DE ARAÚJO MACHADO**  
Medicina Veterinária

**SALVADOR – BAHIA**  
**MARÇO – 2015**

**MARÍLIA CARNEIRO DE ARAÚJO MACHADO**

**EFEITO DE DOSES BAIXAS DE NALTREXONA SOBRE A  
QUALIDADE DE VIDA E SOBREVIDA DE CADELAS COM  
CARCINOMA MAMÁRIO SUBMETIDAS AO TRATAMENTO  
COM CARBOPLATINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos.

Orientadora: Prof. Dra. Alessandra Estrela Lima  
Coorientador: Prof. Dr. João Moreira da Costa Neto

**SALVADOR-BA  
MARÇO/2015**

## Sistema de Bibliotecas da UFBA

Machado, Marília Carneiro de Araújo.

Efeito de doses baixas de naltrexona sobre a qualidade de vida e sobrevida de cadelas com carcinoma mamário submetidas ao tratamento com carboplatina / Marília Carneiro de Araújo Machado. - 2015.

103 f.: il.

Inclui anexos.

Orientadora: Profª. Drª. Alessandra Estrela Lima.

Co-orientador: Prof. Dr. João Moreira da Costa Neto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2015.

1. Citometria de fluxo . 2. Quimioterapia veterinária. 3. Resposta imune. 4. Tumores em animais. I. Lima, Alessandra Estrela. II. Costa Neto, João Moreira da. III. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

CDD - 636.089

CDU - 57.086.8

“Os inventores quase se esqueceram de sua vida, para muitos se lembrarem de seu sonho”.

Alberto Santos Dumont

Dedico este trabalho à minha mãe Nilcere por todos os esforços e amor a mim dedicados e por ter me apresentado a Deus, que hoje é indispensável em minha vida.

Aos animais, por toda a pureza e força que sempre demonstram na luta contra esta imprevisível doença, o câncer.

**Amo vocês!**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado, me protegendo, me dando saúde, iluminando e abençoando minha vida. Sem ele, nada seria possível.

Aos meus queridos pais, Nilcere e Jasson. É impossível expressar todo o meu sentimento apenas com palavras. Obrigada por todo amor, pelas orações, preocupações e apoio que sempre me dão, e por terem me ensinado a trilhar os melhores caminhos da vida, mas acima de tudo por estarem sempre do meu lado e serem muito presentes na minha vida.

Ao meu amor Jacson, que sempre me incentiva e me apoia, pela paciência nos momentos de ausência e carinho nos momentos de angústia. Você é meu Porto Seguro. Eu Te Amo!

A todos os meus familiares, que sempre estiveram torcendo, embora às vezes à distância, pelo meu sucesso profissional. Obrigada pelo apoio, palavras de força e por aliviarem os momentos quando precisei.

À minha querida orientadora, Professora Alessandra Estrela, por acreditar em meu potencial e sempre demonstrar força e vontade de vencer em todos os momentos. Agradeço pelo incentivo, amizade, oportunidades, ensinamentos, conselhos e pelo carinho que tem por mim em todos os momentos. Muito obrigada por ser minha “Estrela-guia”. Com certeza valeu a pena ser orientada pela senhora. Com tuas palavras me fortaleci!!!

Ao Professor João Moreira, meu coorientador, que me proporcionou a possibilidade de crescer profissionalmente dentro da cirurgia, sempre demonstrando interesse, atenção e dedicação. Com certeza, Professor, os seus ensinamentos ficarão marcados na minha memória ao longo da minha jornada na Cirurgia e Oncologia Veterinária, pela qual pretendo seguir.

À família patológica (Laboratório de Patologia Veterinária):

Ao Carlos Humberto (Humbertinho), meu companheiro de mestrado que compartilhou comigo estes momentos de aprendizado. Rimos e nos ajudamos mutuamente;

Ao Mário Jorge pela rotina dos atendimentos e cirurgias, e pela convivência agradável;

Aos Professores Eduardo Moreira e Tiago Peixoto pelos ensinamentos e por me receber no Laboratório de Patologia de braços abertos, sempre dispostos a ajudar em qualquer situação;

Aos Técnicos do laboratório Altemar, Eva, Washington, Zacarias e Williane por toda ajuda oferecida no momento do experimento;

À Laís, minha pupila e oncoirmã, pelas discussões intermináveis sobre os pacientes ou experimento e pelos papos sobre a vida. Amiga para todas as horas, um exemplo de caráter e simplicidade;

Aos Meus Patoirmãos: Nara, Dani, Soy, Drica, Ariane, Keidy, Michelle, Sheila, Manu, Thani, Géssica, Jamile e Marcela. Vocês já moram do lado esquerdo do meu peito e fazem parte de minha segunda família, a família patológica!

E como já dizia a canção da América: *“Amigo é coisa pra se guardar debaixo de sete chaves, dentro do coração (...) Amigo é coisa pra se guardar, no lado esquerdo do peito, mesmo que o tempo e a distância digam não”*. Isto é o mínimo que dedico para vocês.

À Roberta (Beta), minha amiga de todas as horas, a quem eu admiro muito e tenho o prazer de ter como amiga.

À Débora Schäffer, por realizar as anestésias do projeto, sempre tão disposta e de bom humor.

À Professora Stella Barrouin, por ceder gentilmente o kit de Elisa para dosagem da beta-endorfina.

Ao Professor Ricardo Wagner Dias Portela, por toda ajuda na realização do ELISA para dosagens das endorfinas.



Ao Professor Luis Fernando Pita por ceder o Laboratório de Parasitoses, para realização da citometria de fluxo e ao meu colega de mestrado Muller por toda a paciência, simpatia e disposição na parte inicial do experimento.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, representado pelo doutor Márcio Sobreira, por disponibilizar a estrutura, equipamentos e materiais necessários à realização da citometria.

Ao Emanuel (Guga), pela imensa colaboração na análise estatística dos resultados deste trabalho. Sem você seria muito mais difícil!

À Priscila Damasceno, pela ideia do trabalho com naltrexona, e à Lorena, por intermediar este contato. Sem vocês nada disso poderia acontecer!

Aos residentes e funcionários do Hospital Veterinário da UFBA, pelo companheirismo e por tornar o Hospital um ambiente agradável de trabalhar.

A FAPESB e à CAPES, pelo suporte financeiro ao longo de todo o mestrado.

Não poderia deixar de agradecer aos proprietários pela dedicação e compreensão; e principalmente a todas as cadelas que participaram deste estudo. Com vocês aprendi muito mais do que como se trata o câncer e seus sintomas. Eu aprendi o significado da vida.

A TODOS que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho...

**Muito Obrigada!**

**LISTA DE FIGURAS**

		<b>Página</b>
Figura 1	Mecanismo de ação da naltrexona em doses baixas (NDB) sobre o sistema imunológico.	35
Figura 2	Organograma dos grupos experimentais participantes da pesquisa.	41
Figura 3	Avaliação clínica, mastectomia e procedimento quimioterápico em cadelas com carcinoma em tumor misto.	42
Figura 4	Fotomicrografia de carcinoma em tumor misto benigno (CaTMB) mamário canino.	58
Figura 5	Metástases de carcinoma em tumor misto de mama em cadelas.	59
Figura 6	Perfil imunofenotípico de linfócitos T circulantes no sangue periférico de cadelas com carcinoma em tumor misto benigno.	62
Figura 7	Perfil imunofenotípico de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> circulantes no sangue periférico de cadelas com carcinoma em tumor misto benigno.	62
Figura 8	Perfil imunofenotípico de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> circulantes no sangue periférico de cadelas com carcinoma em tumor misto benigno.	63
Figura 9	Razão CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> no sangue periférico de cadelas com carcinoma em tumor misto benigno.	64
Figura 10	Concentrações de beta-endorfina no sangue de cadelas com carcinoma em tumor misto benigno.	65
Figura 11	Concentrações de meta-enkefalina no sangue de cadelas com carcinoma em tumor misto benigno.	66
Figura 12	Representação do escore da qualidade de vida inicial e final das cadelas com CaTMB tratadas com carboplatina, submetidas ou não ao tratamento com NDB.	68
Figura 13	Taxas de sobrevivência dos animais com CaTMB.	70

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
Tabela 1 Idade das 30 cadelas atendidas durante o estudo.	54
Tabela 2 Distribuição racial das 30 cadelas atendidas durante o estudo.	54
Tabela 3 Parâmetros hematológicos em cadelas com carcinoma em tumor misto benigno, divididos em antes e após o tratamento.	56
Tabela 4 Parâmetros bioquímicos séricos em cadelas com carcinoma em tumor misto benigno, divididos em antes e após o tratamento.	57
Tabela 5 Principais manifestações comportamentais relatadas pelos proprietários das 10 cadelas com CaTMB, tratadas com a NDB como método de tratamento adjuvante à quimioterapia.	60
Tabela 6 Parâmetros clínicos e patológicos de cadelas com carcinoma em tumor misto benigno correlacionados com a ausência e presença do tratamento com NDB.	61
Tabela 7 Comparação da qualidade de vida entre grupos e momentos.	69
Tabela 8 Análise univariada e multivariada dos parâmetros clínicos-patológicos associados com a utilização da NDB.	71

**LISTA DE ANEXOS**

	<b>Página</b>
Anexo 1	Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal. 95
Anexo 2	Ficha para exame clínico de tumores mamários caninos. 96
Anexo 3	Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas de mama da cadela (modificado de Owen, 1980). 98
Anexo 4	Ficha de exame necroscópico - Laboratório de Patologia Veterinária (UFBA). 99
Anexo 5	Termo de doação do corpo do animal - Laboratório de Patologia Veterinária (UFBA). 101
Anexo 6	Questionário para avaliação da qualidade de vida de cadelas com neoplasia mamária (YAZBEK; FANTONI, 2005). 103
Anexo 7	Características clínicas e histopatológicas dos carcinomas em tumores mistos benignos após o tratamento estabelecido. SRD: Sem raça definida. 103

**LISTA DE ABREVIATURAS**

BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BSA	Albumina bovina sérica
CaTMB	Carcinoma em tumor misto benigno
CID	Coagulação intravascular disseminada
cm	Centímetro
CEUA	Comitê de ética e experimentação animal
CD4	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares
CD8	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR)
ELISA	Ensaio de imuno-absorbância conjugado a enzima
EMEVZ	Escola de medicina veterinária e zootecnia
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL1	Fluorescência tipo 1
FL2	Fluorescência tipo 2
FSC	Forward scatter (Tamanho celular)
g	Gramma
GH	Growth hormone

HE	Hematoxilina-Eosina
HER-2	Receptor de fator de crescimento epidérmico 2
HOSPMEV	Hospital de Medicina Veterinária
HPLC	High Performance/Pressure Liquide Chromatography
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IGF	Insulin growth factor
IMF	Intensidade média de fluorescência
kg	Quilograma
l	Litro
LDN	Low dose naltrexone
LLD	Látero-lateral direita
LLE	Látero-lateral esquerda
MFF	MaxFacsFix
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
n	Número de casos
NDB	Naltrexona em doses baixas
nm	Nanômetro
OMS	Organização mundial de saúde

OSH	Ovariossalpingohisterectomia
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBS-W	Solução salina tamponada com fosfato-PBS
pg	Picograma
R-PE	Ficoeritrina
rpm	Rotações por minuto
SSC	Side Angle Light Scatter (Granulosidade celular)
SRD	Sem raça definida
TMB	Tetrametilbenzidina
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VD	Ventro-dorsal
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Resumo	
Abstract	
1. Introdução .....	20
2. Revisão de Literatura .....	22
2.1 Neoplasias mamárias na cadela .....	22
2.1.1 Aspectos gerais .....	22
2.1.2 Diagnóstico da neoplasia mamária .....	25
2.1.3 Prognóstico e Qualidade de vida .....	27
2.2 Carcinoma em Tumor Misto Benigno da cadela .....	28
2.3 Tratamento das neoplasias mamárias na cadela .....	30
2.4 Naltrexona .....	32
3. Hipóteses .....	38
4. Objetivos .....	39
4.1 Objetivo geral .....	39
4.2 Objetivos específicos .....	39
5. Material e Métodos .....	40
5.1 Local de execução da pesquisa .....	40
5.2 Animais e grupos experimentais .....	40
5.3 Avaliação pré-operatória .....	41
5.3.1 Exame clínico .....	41
5.4 Exames complementares .....	43
5.5 Procedimento cirúrgico e avaliação pós-operatória .....	43
5.6 Biópsia excisional e análise histopatológica .....	45
5.7 Ensaio de imunofenotipagem no contexto <i>ex vivo</i> .....	45
5.8 Dosagem sérica das concentrações de beta-endorfina .....	48
5.9 Dosagem sérica das concentrações de meta-encefalina .....	49
5.10 Tratamento com naltrexona .....	49



5.11 Quimioterapia com carboplatina .....	50
5.12 Acompanhamento e sobrevida .....	51
5.13 Avaliação da qualidade de vida .....	51
5.14 Análise estatística .....	52
6. Resultados .....	54
6.1 Características clínicas e patológicas .....	54
6.2 Naltrexona .....	59
6.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo do sangue periférico .....	61
6.4 Peptídeos opioides endógenos .....	65
6.5 Qualidade de vida .....	66
6.6 Comparação das curvas de sobrevida .....	69
7. Discussão .....	72
8. Conclusões .....	79
9. Referências Bibliográficas .....	80
10. Anexos .....	95

***Efeito de doses baixas de naltrexona sobre a qualidade de vida e sobrevida de cadelas com carcinoma mamário submetidas ao tratamento com carboplatina***

**Resumo**

É crescente o número de estudos que buscam novas abordagens terapêuticas para o carcinoma em tumor misto benigno (CaTMB), neoplasia mamária mais frequente na cadela e que apresenta variável potencial de malignidade. Neste contexto, objetivou-se a partir da realização deste trabalho avaliar o efeito da naltrexona em doses baixas (NDB) sobre a resposta imune de cadelas com CaTMB submetidas à mastectomia, seguido por tratamento quimioterápico com carboplatina e verificar sua associação com a qualidade de vida e a sobrevida. Foram estudadas 30 cadelas, todas com diagnóstico histopatológico de CaTMB, divididas em três grupos experimentais: Grupo 1: Controle, constituído por animais submetidos apenas a mastectomia subdivididos em pacientes sem metástase regional (CaTMB(-)) e com metástase regional (CaTMB(+)); Grupo 2, todos sem metástase e Grupo 3 todos com metástase. Os grupos 2 e 3 também foram subdivididos, mas de acordo com o tratamento: tratados com quimioterapia (CaTMB(-) Q/CaTMB(+) Q e tratados com quimioterapia e NDB (CaTMB(-) Q+NDB / CaTMB(+) Q+NDB). Todos os animais foram submetidos à avaliação clínica, mastectomia, imunofenotipagem dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> circulantes no sangue periférico, dosagem de beta-endorfina e meta-enkefalina, além da avaliação da taxa de sobrevida e dos escores de qualidade de vida, periodicamente. Os resultados revelaram maior porcentagem de células T e T CD8<sup>+</sup> nos animais do grupo CaTMB(-) Q+NDB ( $p < 0,05$ ), maiores concentrações séricas de beta-endorfina e meta-enkefalina, redução dos efeitos colaterais relacionados a quimioterapia, bem como melhor qualidade de vida e sobrevida nos grupos tratados com NDB em relação aos grupos não tratados. A avaliação dos parâmetros clínico-patológicos, tanto na análise univariada quanto na multivariada, indicaram a associação significativa da utilização do NDB com a condição vivo, utilização da quimioterapia, maior sobrevida e qualidade de vida. Estes resultados associados indicam que a NDB representa uma alternativa viável de tratamento adjuvante à quimioterapia em cadelas com CaTMB, pois aumenta as concentrações de beta-endorfina e meta-enkefalina e estimula a resposta dos linfócitos CD8<sup>+</sup>, proporcionando manutenção da qualidade de vida e contribuindo para o aumento na taxa de sobrevida destes pacientes.

**Palavra-chave:** Citometria de fluxo, quimioterapia, resposta imune, tumor de mama

*Effect of low dose naltrexone as a carboplatin chemotherapy-associated drug on the quality of life and survival of female dogs with mammary carcinoma*

**Abstract**

Recently, it can be noticed an increasing number of scientific reports on dog benign mixed carcinoma tumor (CaTMB), mainly focusing on new therapeutic approaches. This is the most frequent breast tumor in female dogs and presents a variable malignant potential. In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of low dose naltrexone (LDN) on the immune response of female dogs with CaTMB after mastectomy and chemotherapy with carboplatin, and to verify its association with quality of life and survival rates. 30 female dogs were included in this study, all of them with histopathological diagnosis of CaTMB; they were divided into three experimental groups: Group 1: Control, consisting of animals submitted to mastectomy and with or without regional metastasis; Group 2, composed of animals that did not presented metastasis; and Group 3, including dogs that presented metastasis. Groups 2 and 3 also were subdivided according to the treatment performed: chemotherapy alone (CaTMB(-) Q / CaTMB(+) Q), and LDN-associated chemotherapy (CaTMB(-) Q+LDN / CaTMB(+) Q+LDN). All animals were subjected to clinical evaluation, mastectomy, immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes, beta-endorphin and met-enkephalin dosage, and evaluation of the survival rates and quality of life scores. The results showed a higher percentage of CD3+ and CD3+ / CD8+ in the CaTMB(-) Q+LDN ( $p < 0,05$ ) group, higher serum concentrations of beta-endorphin and met-enkephalin, decreased chemotherapy related side effects, as well as better quality of life and survival rates, when comparing the group treated with LDN to the LDN-untreated group. The evaluation of clinical and pathological parameters indicated a significant association between the use of LDN with the use of chemotherapy, prolonged survival and quality of life. These results indicate that LDN is a viable chemotherapy-associated treatment in female dogs with CaTMB, providing maintenance of life quality and prolonged survival rates.

**Keyword:** Chemotherapy, flow cytometry, immune response, mammary tumor

## 1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias em cadelas são frequentemente observadas na clínica de pequenos animais, correspondendo a cerca de 53% do total dos tumores, dos quais até 90% são carcinomas (PAOLONI; KHANNA, 2008; ESTRELA-LIMA et al., 2010). Em razão desta alta frequência e das diversas similaridades epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas existentes entre estes tumores de mulheres e cadelas, existe um grande interesse dos pesquisadores no estudo comparativo entre as duas espécies (MISDORP, 2002; UVA et al., 2009; RIVERA; VON EULER, 2011).

Dentre os tumores malignos de mama em cadelas, o carcinoma em tumor misto benigno (CaTMB) é o mais frequente, correspondendo a cerca de 42% das neoplasias diagnosticadas nesta espécie (TORIBIO, 2008; RODASKI; PIEKARZ, 2009; ESTRELA-LIMA et al., 2010). Este tumor tem origem a partir da transformação maligna do componente epitelial do tumor misto benigno e pode apresentar crescimento *in situ* ou infiltrativo, evidenciado pela perda da continuidade das camadas mioepitelial e basal associado à invasão de células neoplásicas no estroma, ou ainda substituí completamente a lesão benigna pré-existente (DAMASCENO, 2012; CASSALI et al., 2014).

Diante da alta frequência deste tipo histológico, da variação do grau que lhe confere maior potencial de malignidade e escassez de dados na literatura, esforços estão sendo direcionados para o estudo de novas terapias adjuvantes. Busca-se a inserção de novos protocolos terapêuticos que possam proporcionar maiores taxas de cura, longevidade e principalmente melhor qualidade de vida aos pacientes caninos, refletindo diretamente no aumento da taxa de sobrevida.

Até o momento, a terapia cirúrgica realizada com ampla margem de segurança é a forma de tratamento que confere maior sobrevida para cadelas com câncer de mama (RODASKI; PIEKARZ, 2009). Os protocolos com fármacos antineoplásicos podem ser utilizados como tratamento adjuvante à mastectomia, promovendo maior

sobrevida e redução do potencial de recidiva dos tumores mamários (QUEIROGA; LOPES, 2002).

No homem, já foi demonstrado que a utilização de naltrexona em doses baixas (NDB), referenciado em inglês como *low dose naltrexone* (LDN), como tratamento adjuvante à quimioterapia proporciona maior sobrevida em alguns tipos de câncer (ZAGON; MCLAUGHLIN, 2005), inclusive o de mama. O NDB possui a capacidade de reduzir os efeitos colaterais da quimioterapia, estimular o sistema imunológico e promover o bem-estar, podendo ser utilizado como tratamento isolado ou combinado a cirurgia e quimioterapia (DONAHUE et al., 2011).

Desta forma, considerando as diversas similaridades entre os tumores de mama na mulher e na cadela e a importante casuística dos carcinomas em tumores mistos nesta última espécie, se torna imprescindível propor e testar novos tratamentos combinados para este tipo de neoplasia. Neste contexto, objetivou-se com a realização do presente estudo avaliar a utilização de naltrexona em doses baixas (NDB) como método de tratamento adjuvante à quimioterapia, seus efeitos sobre a sobrevida e qualidade de vida das cadelas portadoras de carcinomas em tumores mistos benignos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Neoplasias mamárias na cadela**

#### **2.1.1 Aspectos gerais**

Os tumores mamários correspondem ao tipo mais frequente de neoplasias em cadelas, e estão entre as principais causas de morte nesses animais (HELLMÉN et al., 1993; HENDERSON; FEIGELSON, 2000; DOBSON et al., 2002; LEE et al., 2004; UVA et al., 2009; FELICIANO et al., 2012; DOBSON, 2013; SÉVÈRE et al., 2015). As neoplasias mamárias em cadelas apresentam características epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas similares às observadas nos tumores de mama na mulher, sendo de interesse o conhecimento de sua etiopatogenia e de suas características biológicas para estudos comparativos (RICHARDS et al., 2001; MERLO et al., 2008; UVA et al., 2009; RIVERA; VON EULER, 2011).

Segundo Peleteiro (1994) não existe predisposição racial para o desenvolvimento de tumores mamários na cadela. No entanto, estudos no Brasil mencionam que tal neoplasia ocorre com maior incidência em Poodles e cães sem raça definida (CAVALCANTI; CASSALI, 2006; FURIAN et al., 2007; TORÍBIO, 2008; ESTRELA-LIMA, 2010).

A etiologia das neoplasias mamárias possui característica multifatorial, envolvendo componentes genéticos, nutricionais, ambientais e, principalmente, hormonais (HENDERSON e FEIGELSON, 2000; JONES et al., 2000; TODOROVA, 2006; UVA et al., 2009; ANDRADE et al., 2010). O estrógeno e a progesterona desempenham um papel importante no desenvolvimento da glândula mamária normal, além de atuarem no desenvolvimento de tumores mamários em cadelas e gatas. Sabe-se que os hormônios esteróides atuam estimulando a proliferação celular e predisõem às alterações genéticas que darão origem à célula neoplásica (SILVA et al., 2004; THURÓCZY et al., 2007; BOCARDO et al., 2008).

Em cães, a progesterona exógena estimula a síntese do hormônio do crescimento (GH) na glândula mamária, causando a proliferação lóbulo-alveolar, com consequente hiperplasia de elementos mioepiteliais e secretórios (MISDORP, 2002; RODASKI; PIEKARZ, 2009). Já concentrações elevadas de GH, juntamente com níveis crescentes de IGF (fator de crescimento insulina-símile) tipo I e II, estimulam o recrutamento de células-tronco, com posterior proliferação e diferenciação celular como observado na próstata e ovários (MOL et al., 1996; VAN GARDEREN; SCHALKEN, 2002). A progesterona, GH, e IGF-I têm um papel essencial em tornar a glândula mamária mais susceptível aos fatores carcinogênicos indutores de mutações, resultando no desenvolvimento do tumor ou estimulando o crescimento de tumores já estabelecidos (MOL et al., 1996).

Desta maneira, a utilização de progestágenos injetáveis, administrados como método contraceptivo ao animal pelo proprietário ou por indicação veterinária, influencia significativamente no desenvolvimento de tumores mamários benignos (MISDORP, 1988; SILVA et al., 2004). Já a administração de estrógeno, quando combinada com progesterona e utilizado de forma contínua e em altas doses, aumenta o risco de desenvolvimento de tumores de mama malignos (RODASKI; PIEKARZ, 2009). O estrógeno auxilia no crescimento celular por estimular a liberação do fator de crescimento tumoral alfa e fator de crescimento semelhante à insulina, além de estimular o crescimento ductal (MISDORP, 2002; LANA et al., 2007). Apesar dos hormônios esteróides sexuais femininos, especialmente o estrógeno, desempenharem papel fundamental no desenvolvimento dos tumores mamários em cadelas, a supressão hormonal pela ovariossalpingohisterectomia (OSH) pode ser utilizada como tratamento adjuvante desta neoplasia (FONSECA; DALECK, 2000).

Quando a OSH é realizada antes do primeiro estro, o risco de desenvolvimento de tumores mamários é de 0,5%, e este risco aumenta significativamente nas fêmeas esterilizadas após o primeiro (8%) e o segundo ciclo estral (26%) (SCHNEIDER et al, 1969). Em alguns estudos, não foi observada uma capacidade protetora da OSH com relação às neoplasias mamárias, quando realizada após o terceiro ciclo estral, independente da presença do processo neoplásico (MORRIS et al., 1998; FONSECA; DALECK, 2000; MUNSON; MORESCO, 2007). Contudo, Sorenmo e colaboradores

(2011) relatam maior sobrevida das cadelas submetidas à mastectomia associada à castração ou quando esta é realizada até 24 meses antes da exérese do nódulo primário.

Existe uma relação direta entre a idade do animal e a probabilidade de desenvolvimento de tumores mamários, com o predomínio dos tumores em cadelas entre nove a 11 anos de idade, sendo pouco frequente em animais com menos de quatro anos (LANA et al., 2007; SORENMO et al., 2011).

O aumento da incidência de neoplasias mamárias pode ser explicado, dentre outras razões, pelo aumento da vida média dos animais domésticos, o que reflete em aumento da eficácia no diagnóstico e tratamento das doenças, bem como em uma preocupação crescente dos proprietários com seus animais de companhia (THURÓCZY et al., 2007; QUEIROGA et al., 2011).

Os fatores nutricionais têm sido objeto de estudos em tumores da glândula mamária em cadela, por possivelmente atuarem como agentes desencadeantes deste tipo de neoplasia (RODASKI; PIEKARZ, 2009). Sabe-se que, na mulher a obesidade está diretamente relacionada com a concentração e disponibilidade de hormônios sexuais femininos (WILLETT, 2000). Estudos epidemiológicos demonstraram que dietas ricas em gordura e uma condição corporal obesa podem aumentar o risco de desenvolvimento de neoplasia mamária em cadelas, principalmente na fase juvenil (PÉREZ-ALENZA et al., 1998; CLEARY et al., 2010).

A relação entre obesidade e desenvolvimento dos tumores de mama parece ocorrer principalmente por ação do estrógeno, da leptina e da adiponectina (CLEARY et al., 2010). Pesquisas recentes em medicina revelaram o papel da adiponectina e leptina, adipocitoquinas produzidas no tecido adiposo e cujas concentrações se alteram mediante o peso corporal, influenciam no desenvolvimento e na progressão destas neoplasias (ROSE et al., 2004; HOU et al., 2007). Desta maneira, quando o peso e o índice de massa corporal aumentam, os níveis séricos de leptina aumentam e de adiponectina diminuem, pois a leptina inibe a apoptose e estimula a proliferação celular, enquanto a adiponectina reduz a proliferação celular e promove a apoptose, atuando de forma inversa à primeira (SCHINDLER et al., 1989; ARTWOHL et al., 2002; FUJITA et al., 2002; DIEUDONNE et al., 2006).



Em um estudo retrospectivo sobre fatores prognósticos e sobrevida em cadelas com tumores mamários malignos, realizado por Philibert e colaboradores (2003), observou-se que a obesidade poderia predispor a uma maior concentração de estrógeno circulante, juntamente com outros hormônios, favorecendo a proliferação de células epiteliais com receptores para estes hormônios. No entanto, não foi verificada correlação significativa entre obesidade e predisposição ao desenvolvimento de neoplasias mamárias na cadela, no estudo em questão.

Recentemente, Andrade e colaboradores (2010) demonstraram a presença de concentrações significativas de inseticidas piretróides no tecido adiposo adjacente aos tumores mamários de cadelas, principalmente, nos tumores mais agressivos, sugerindo o possível envolvimento de contaminantes ambientais na carcinogênese mamária. Neste estudo, a partir da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) foi possível detectar e identificar contaminantes ambientais no tecido adiposo adjacente ao tumor, destacando-se a aletrina, a cialotrina, a cipermetrina, a deltametrina e a tetrametrina.

### **2.1.2 Diagnóstico da neoplasia mamária**

Independente da etiologia, as neoplasias mamárias podem se apresentar como nódulos pequenos ou grandes, aderidos ou móveis, únicos ou múltiplos, dependendo do comportamento biológico do tumor (SORENMO et al., 2011). Em alguns casos o tumor pode apresentar ulceração cutânea ou sinais evidentes de inflamação, como é observado no carcinoma inflamatório (QUEIROGA; LOPES, 2002; SOUZA et al., 2009; ROCHA et al., 2015). As glândulas mamárias abdominais caudais e inguinais são mais afetadas, provavelmente pela maior quantidade de parênquima glandular (MOULTON, 1990).

O diagnóstico de neoplasia mamária tem início a partir do histórico reprodutivo (uso de progestágenos, ciclos reprodutivos e lactação), o exame físico (presença de uma ou várias massas mamárias, quais as mamas acometidas, secreções e/ou ulcerações), além de exames radiográficos de tórax e ultrassonografia abdominal (SORENMO et al., 2011; CASSALI et al., 2014).

Dispnéia, tosse e claudicação associada a neoplasia pode indicar a presença de metástases (HEDLUND, 2008). Os exames de diagnóstico por imagem buscam evidências de metástases à distância e correspondem a radiografias (torácica e abdominal) e ultrassonografia (FELICIANO et al., 2012). Para as radiografias torácicas são recomendadas a realização de três projeções (laterais direita e esquerda e ventrodorsal), que podem revelar a evidência de metástase aos pulmões, pleura e linfonodos intratorácicos (RODASKI; PIEKARZ, 2009). Estudos revelam que nódulos metastáticos pulmonares menores de 0,5 mm podem não ser observados no exame radiográfico e, portanto, nestes casos, a tomografia computadorizada apresenta maior acurácia na detecção de metástases pulmonares (OTONI et al., 2010; ALEXANDER et al., 2012).

O estadiamento clínico é determinado de acordo com o sistema TNM estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para tumores mamários caninos (MISDORP et al., 1999). Com base no sistema TNM são avaliados tamanho tumoral (T), acometimento de linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M) (modificado de OWEN, 1980). A classificação dos animais em estadios auxilia na indicação prognóstica, além de permitir o planejamento do tratamento das neoplasias mamárias (QUEIROGA; LOPES, 2002).

A citologia aspirativa por agulha fina, por seu turno, é um método auxiliar no diagnóstico, sendo de utilização simples e imediata (RODASKI; PIEKARZ, 2009). Tal exame é indicado principalmente quando se suspeita de metástases em linfonodos, na avaliação de processos benignos, como cistos ou abscesso e para exclusão de diagnósticos diferenciais, como mastite, lipomas e mastocitoma (CASSALI et al., 2014). No entanto, o diagnóstico definitivo para as neoplasias mamárias baseia-se no exame histopatológico (MAGALHÃES et al., 2001; QUEIROGA; LOPES, 2002). A análise histopatológica revela o tecido de origem (epitelial, mioepitelial ou mesenquimal) e, além disso, possibilita avaliar outros tipos de critérios de importância prognóstica como a presença de necrose tumoral, a arquitetura tecidual e grau de malignidade do tumor (MISDORP, 2002).

Assim como o tamanho tumoral, envolvimento neoplásico de linfonodos, invasividade, presença de êmbolos neoplásicos e atividade mitótica, a graduação histopatológica pode ser considerada um indicador prognóstico no câncer de mama tanto na mulher quanto na cadela (UVA et al., 2009). Tais parâmetros, realizados apenas nos tumores malignos, têm como objetivo avaliar o grau de diferenciação e proliferação da neoplasia, as variações morfológicas do núcleo e o índice mitótico, apresentando importante correlação com agressividade e conseqüentemente com o prognóstico (ELSTON; ELLIS, 1991).

### **2.1.3 Prognóstico e Qualidade de vida**

Além da graduação histopatológica, o prognóstico apresenta relação direta com a qualidade de vida e a sobrevivência e, portanto, a avaliação deste fator pode auxiliar na decisão do tratamento, servindo como indicador de prognóstico (LYNCH et al., 2011; HORTA et al., 2012). A escolha dos fatores que compõem a definição de qualidade de vida tem como base o conceito de saúde, e de acordo com McMillan (2000) devem ser avaliados parâmetros como ausência ou presença mínima de desconfortos físicos (náusea, retenção urinária, prurido, dor, tosse e dispnéia), além de fatores emocionais, como medo, ansiedade, solidão e frustrações.

Em oncologia, a avaliação da qualidade de vida busca demonstrar diferenças de resposta dos pacientes frente a tipos específicos de câncer, avaliar o alívio dos sintomas e comparar a resposta aos tratamentos (YAZBEK, 2008). Na medicina veterinária, critérios e questionários de avaliação estão em constante estudo e tem sido desenvolvidas formas de avaliação para vários tipos de doenças como osteoartrite (BROWN et al., 2007), dermatite atópica (FAVROT et al., 2010), diabetes mellitus (NIESSEN et al., 2012), dor crônica (WISEMAN-ORR et al., 2006) e no câncer (MELLANBY et al., 2003; LYNCH et al., 2011; REID et al., 2013).

Yazbek e Fantoni (2005) validaram a primeira escala de avaliação da qualidade de vida relacionada à saúde em cães com dor crônica secundária ao câncer. Os autores demonstraram a baixa qualidade de vida de cães com dor oncológica moderada,

ênfatizando assim a importância da constante avaliação durante o tratamento. Esta escala tem sido utilizada como método complementar e auxiliar na avaliação da qualidade de vida do paciente oncológico na rotina da clínica de pequenos animais (YAZBEK, 2008).

Desta forma, é crescente a procura por fatores prognósticos e preditivos, que permitem selecionar pacientes para tratamentos específicos e individualizados, e condutas terapêuticas que aumentem a sobrevivência e, principalmente, proporcionem melhor qualidade de vida às pacientes oncológicas.

## **2.2 Carcinoma em Tumor Misto Benigno da cadela**

Os carcinomas em tumores mistos de mama são provenientes da transformação maligna do componente epitelial de tumores mistos benignos primários (MISDORP et al., 1999). Tal tipo histológico consiste em um dos tumores mais frequentes de neoplasia mamária nesta espécie, representando cerca de 42% dos tumores malignos diagnosticados na mama de cadelas (MOULTON et al., 1970; MISDORP et al., 1999; CASSALI et al., 2009) e podendo alcançar o percentual de 56,7% segundo achados de Toríbio (2008). Estes tumores são considerados pouco frequentes em mulheres e apresentam características histológicas comparáveis ao carcinoma metaplásico da mama em seres humanos (GENELHU et al., 2007).

O carcinoma metaplásico na mulher frequentemente apresenta um prognóstico desfavorável, sendo frequentes as metástases à distância, mesmo quando os linfonodos regionais não estão acometidos (REIS-FILHO et al., 2005; TSE et al., 2006; LUINI et al., 2007).

Os carcinomas em tumores mistos são caracterizados histologicamente pela proliferação de elementos mesenquimais, mioepiteliais e epiteliais. Este último componente pode sofrer malignização seja pela longa evolução da neoplasia, ou pela recorrência (MOULTON et al., 1970; LEONETTI et al., 2005; GENELHU et al., 2007). Em uma pesquisa realizada por Moulton e colaboradores (1970) foi levantada a

hipótese de que se os tumores mistos tivessem tempo suficiente para crescer, poderiam sofrer malignização. Posteriormente, Genelhu e colaboradores (2007) e Bertagnolli et al. (2009) observaram alterações de proteínas que podem contribuir para transformação maligna dos tumores mistos benignos, tais como a perda da expressão de p63,  $\Delta$ Np63, E-caderina e  $\beta$ -catenina.

Em um estudo recente foi observado que a super-expressão de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) pelas células epiteliais malignas pode ser um evento precoce na carcinogênese dos tumores mistos (BERTAGNOLLI et al., 2011). E ainda, alterações na expressão desta molécula podem ser cruciais no processo de transformação maligna do componente epitelial deste tipo histológico.

Para a elucidação dos mecanismos envolvidos no comportamento biológico destes tumores, foram realizadas avaliações fenotípicas de células mioepiteliais e componentes da matriz extracelular (ERDÉLYI et al., 2003). Dentre estes componentes, destaca-se o versicam, um proteoglicano produzido pelas células estromais em tecidos como músculos lisos, cartilagem e pele (BODE-LESNIEWSKA et al., 1996). A expressão do versicam em carcinoma em tumor misto benigno de cadelas apresentou diferença significativa entre áreas invasiva e *in situ*, sugerindo assim que esta molécula possui importante papel na progressão tumoral (DAMASCENO et al., 2012).

Neste contexto, considerando a importância da casuística dos carcinomas em tumores mistos na cadela, tornam-se necessários estudos que possibilitem uma melhor compreensão deste tipo histológico, bem como a adoção de condutas terapêuticas adequadas, visando melhor qualidade de vida e aumento da sobrevivida.

### **2.3 Tratamento das neoplasias mamárias na cadela**

O procedimento cirúrgico consiste, ainda hoje, no tratamento de eleição e que confere maior taxa de sobrevivida, incluindo a cura desde que seja realizado precocemente (QUEIROGA; LOPES, 2002; HEDLUND, 2008). Contudo, nos casos

de carcinoma inflamatório mamário, neoplasia altamente invasiva, este procedimento não é indicado em consequência do elevado risco de disseminação tumoral, septicemia e desenvolvimento de CID (coagulação intravascular disseminada), que cursa com hemorragias profundas durante o procedimento cirúrgico (CASTELLANO; IDIART, 1994; RODASKI; PIEKARZ, 2009; RIBEIRO et al., 2015).

Existem inúmeras técnicas cirúrgicas descritas na literatura para as cadelas, como nodulectomia, mastectomia simples, mastectomia regional, mastectomia unilateral e mastectomia bilateral (LANA et al., 2007; RODASKI; PIEKARZ, 2009). No entanto, o tipo de cirurgia deve ser determinado para cada caso em específico, pois o mesmo está ligado diretamente ao estado geral do paciente, número e tamanho dos tumores, sua localização na glândula mamária (associado com a drenagem linfática) e experiência do cirurgião (HEDLUND, 2008).

A quimioterapia antineoplásica é um método de tratamento neoadjuvante ou adjuvante à cirurgia, que promove destruição das micrometástases, reduzindo assim o potencial de recidiva dos tumores mamários (QUEIROGA; LOPES, 2002). Os protocolos propostos na literatura consistem na utilização de cisplatina ou carboplatina como drogas individuais ou combinadas com a doxorrubicina.

A cisplatina é um derivado de platina que provoca nefrotoxicidade potencialmente irreversível, além de ser dose-cumulativa (NEVES; VARGAS, 2011). Em contrapartida, a carboplatina, derivado de segunda geração da platina, é menos nefrotóxica que a cisplatina, não sendo necessário induzir a diurese salina (RODASKI; DE NARDI, 2008). Sua estrutura difere da cisplatina pela presença de ligantes do tipo carboxilato no lugar dos ligantes abandonadores cloreto, conferindo maior solubilidade em água, comparado à cisplatina (WHEATE et al., 2010). A carboplatina também é menos reativa, ligando-se em menor extensão às proteínas do plasma, além de ser mais facilmente excretada pela urina (NEVES; VARGAS, 2011). Todos estes fatores reduzem a toxicidade da carboplatina, o que aumenta a dose da droga tolerada pelo organismo (RODASKI; DE NARDI, 2008).

A carboplatina é um citostático empregado no tratamento de osteossarcoma canino e carcinoma de tecidos moles e dentre os efeitos colaterais mais comumente

observados estão as alterações renais, sendo necessária avaliação da função renal antes e durante o tratamento, além de efeitos gastrointestinais como anorexia, vômito e constipação, também podendo ocorrer as alterações hepáticas (RODASKI; DE NARDI, 2008). Entretanto, o principal efeito colateral da carboplatina é hematológico, que se manifesta principalmente por leucopenia, podendo também ocorrer anemia (LANA et al., 2007). A mielossupressão é observada entre 10 e 14 dias, período denominado “nadir da droga”, e pode ser severa (GOTTESMAN, 2002). O nadir do quimioterápico corresponde ao tempo transcorrido entre a aplicação da droga e a ocorrência do menor valor de contagem hematológica (RODASKI; DE NARDI, 2008).

Cães com tumores grandes e de alta graduação histopatológica, com grande chance de desenvolver metástases podem se beneficiar de terapias adicionais como a quimioterapia (CASSALI et al., 2014). Segundo Novosad (2003), a radioterapia e a hormonioterapia são considerados métodos alternativos para o tratamento dos tumores mamários, no entanto ainda são pouco utilizados na medicina veterinária em virtude da escassez de estudos realizados em cães. A dificuldade em se obter sucesso na radioterapia em animais está relacionada com o custo, programas de tratamento e indisponibilidade de técnicos e aparelhos especializados, no entanto apresenta resultados satisfatórios para qualidade de vida do paciente e estética (RODASKI; PIEKARZ, 2009; MORETTO; CORRÊA, 2013).

No que concerne à hormonioterapia, este tratamento está indicado em tumores que exibam positividade para receptores de estrógeno, progesterona ou prolactina. Na medicina, a terapia hormonal é considerada o tratamento de rotina, notadamente pela utilização do citrato de tamoxifeno, que atua como um inibidor seletivo dos receptores de estrógeno na glândula mamária (JORDAN, 2006). Contudo, devido ao elevado risco de desenvolvimento de incontinência urinária e piometra em cadelas, a administração do tamoxifeno é indicado apenas para cadelas esterilizadas (TAVARES et al., 2010).

Outrossim, terapêuticas específicas para o bloqueio das atividades de receptores hormonais como HER2 e EGFR, que são receptores dos fatores de crescimento epidérmico, tem sido amplamente estudada em neoplasias mamárias humanas, a

exemplo do trastuzumabe, imatinibe, bevacizumabe, cetuximabe, gefitinibe e erlotinibe (LEITE et al., 2012). As mutações nestes protooncogenes estão entre as principais alterações genéticas relacionadas com o desenvolvimento do câncer em seres humanos (YAZIJI et al., 2004; BHARGAVA et al., 2005). Contudo, alterações de HER2 e EGFR já foram detectadas nos tumores mamários da cadela, mas o seu papel na gênese e progressão dos tumores mistos é desconhecido (GERALDES et al., 2000; DUTRA et al., 2004; BERTAGNOLLI et al., 2011).

Na literatura há menção do uso da imunoterapia como tratamento adjuvante em neoplasias mamárias, com aumento do tempo de sobrevida e regressão de metástases pulmonares (LANA et al., 2007). Em um estudo observou-se que a administração de BCG (Bacilo Calmette-Guérin) em cadelas com tumores mamários, em intervalos de uma, duas e quatro semanas e então a cada oito semanas, até completar um ano pós-cirúrgico, foi associada a um aumento de sobrevida (NUNES et al., 2011).

Por conseguinte, dada a complexidade no desenvolvimento do processo tumoral mamário, as modalidades terapêuticas têm sido cada vez mais alvo de constante atualização, com tendências para preconização de tratamentos combinados e personalizados.

## **2.4 Naltrexona**

A naltrexona é um fármaco análogo sintético da oximorfina, utilizado pela medicina como antagonista opioide, que se liga reversivelmente pelos receptores específicos de opioides ( $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ ), podendo assim bloquear os efeitos dos opioides endógenos (LEE; FUJIOKA, 2009). Tal como a naloxona, a naltrexona é um antagonista puro, ou seja, não possui qualquer atividade agonista, porém apresenta melhor biodisponibilidade e duração de ação mais longa (O'CONNOR; KOSTEN, 1998).

No homem, após a ingestão a naltrexona é rapidamente absorvida, cerca de 96% da dose pela mucosa gástrica, com pico de concentração plasmática da droga



ocorrendo após uma hora (TERRA; TSUNODA, 1998). Seu metabolismo é hepático e excreção renal e fecal, em maior e menor proporção respectivamente (O'CONNOR; KOSTEN, 1998; CRIAR et al., 2010). O maior metabólito da naltrexona é o 6- $\beta$ -naltrexol e os dois metabólitos menores são o 2-hidroxi-3-metoxi-6- $\beta$ -naltrexol e o 2-hidroxi-3-metil-naltrexona (SHARAFADDINZADEH et al., 2010). O perfil farmacocinético da naltrexona sugere que a mesma e seus metabólitos podem sofrer reciclagem enterohepática (SAYYAH et al., 2013).

Na literatura existem relatos de tratamento bem sucedidos com naltrexona, e dentre eles estão o tratamento do prurido grave (METZE et al., 1999), terapia para obesidade (LEE; FUJIOKA, 2009), inibição do fator de crescimento do neuroblastoma em ratos (ZAGON; MC LAUGHLIN, 1983), tratamento adjuvante contra a AIDS (BIHARI et al., 1988), esclerose múltipla e doenças auto-imunes como lúpus, artrite e fibromialgia (AGRAWAL, 2005). A naltrexona vem também sendo usada como tratamento adjuvante de algumas neoplasias, a exemplo dos tumores de mama (TEJWANI et al., 1991), pâncreas (BERKSON et al., 2006), neuroblastoma (LISSONI et al., 2002) e tumores de ovário (DONAHUE et al., 2011).

A naltrexona em baixas doses (3 a 4 mg diariamente) antes de dormir, atua na hipófise e na supra-renal, ocupando de forma reversível os receptores opioides endógenos ( $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ ) por 3 a 4 horas (LEE; FUJIOKA, 2009). Após este período a naltrexona se desliga destes receptores, fazendo com que o organismo aumente em duas a três vezes a produção de peptídeos opioides endógenos (beta-endorfina e meta-enkefalina, na hipófise e supra-renal, respectivamente) como resposta tipo “feedback” positivo, as quais saturam estes receptores quando a naltrexona deixa de ocupá-los (ZAGON; MCLAUGHLIN, 2005).

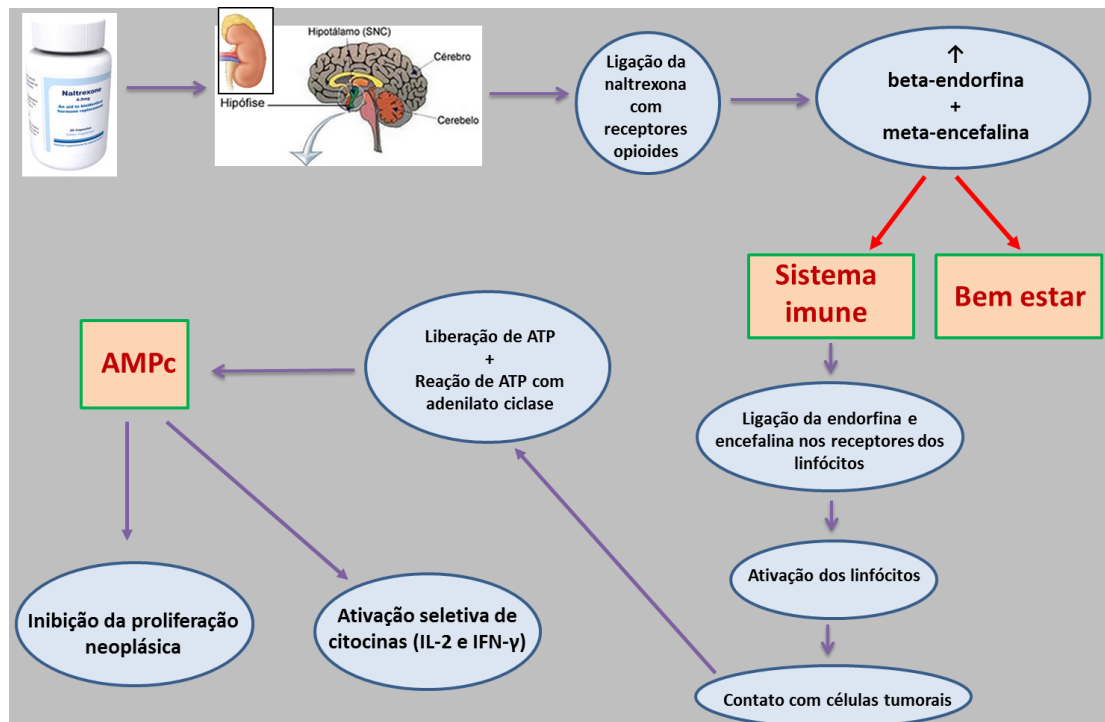
Cada família de peptídeo opioide endógeno origina-se de um gene distinto e de um dos três precursores protéicos, tais como a proopiomelanocortina (POMC), a proencefalina (PENK) e a prodinorfina, sendo então processados a endorfina, a encefalina e a dinorfina, respectivamente (MOUSA et al., 2004). Estes peptídeos exibem diferentes afinidades pelos receptores opioides:  $\mu$  (endorfina e encefalina),  $\Delta$

(encefalina e endorfina) e  $\kappa$  (dinorfina) e são detectados em várias células imunes (HOLLT, 1986).

A meta-encefalina é uma endorfina que ativa os receptores delta-opioides, os quais produzem o fator de crescimento anti-tumoral (PLOTNIKOFF et al., 1987). Ademais, este tipo de endorfina provoca diminuição do crescimento tumoral, diminuição da síntese de DNA e diminuição do índice mitótico via inibição do ciclo celular (ZAGON et al., 2008; BROWN; PANKSEPP, 2009). Células malignas expostas à meta-encefalina apresentam aumento de células na fase G0/G1 e diminuição das células na fase S e G2/M, caracterizando drástica diminuição da proliferação (ZAGON; MCLAUGHLIN, 2005).

Naltrexona em doses baixas promove um aumento das concentrações séricas de peptídeos opioides endógenos, que conseqüentemente vão induzir o aumento da efetividade dos linfócitos (HOLLT, 1986). Tanto em roedores quanto em humanos, os linfócitos expressam receptores para peptídeos opioides endógenos, sendo que a ativação destes receptores resulta no acúmulo intracelular de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) indicando que estes receptores são funcionais (HAZUM et al., 1979).

Na membrana das células inclusive as tumorais, as endorfinas se ligam a receptores opioides, e por sua vez os linfócitos se ligam aos peptídeos opioides endógenos (endorfinas), pois possuem receptores para estes (LEE; FUJIOKA, 2009). Na membrana das células neoplásicas a naltrexona induz aumento do número de receptores opioides, com conseqüente aumento da efetividade dos linfócitos, fazendo com que tais células sejam mais responsivas aos efeitos inibidores do crescimento tumoral, provocando a apoptose das células malignas (morte celular) (STEIN et al., 2003) (Figura 1).



**Figura 1. Mecanismo de ação da naltrexona em doses baixas (NDB) sobre o sistema imunológico.** Fonte: Autoria própria.

Em um experimento realizado com neoplasia óssea maligna e cirurgias de joelho em humanos, demonstrou-se que a injeção local de doses baixas de antagonistas de opioides nos locais inflamados causou exacerbação do quadro algíco, indicando fortemente que peptídeos opioides endógenos são continuamente liberados e têm uma ação de combate à dor (STEIN; LANG, 2009). Estes peptídeos opioides formados induzem uma resposta imune aguda, aumentando a função dos linfócitos, particularmente o CD8<sup>+</sup> (CABALLERO-HERNÁNDEZ et al., 2005).

Estrela-Lima e colaboradores (2012) comprovaram forte associação entre sistema imunológico e tumores mamários em cadelas, sugerindo a análise dos linfócitos presentes no sangue periférico como potenciais biomarcadores na avaliação do prognóstico e da sobrevida. Neste estudo, foi observado uma diminuição da proporção de células T CD4<sup>+</sup>, além de um maior percentual de células T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de cadelas com neoplasia mamária sem metástase para linfonodo regional. A partir deste trabalho, acredita-se que, enquanto os linfócitos T CD8<sup>+</sup>

desempenham um importante papel protetor no controle do desenvolvimento tumoral, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> podem apresentar uma dupla função, participando na resposta imune específica ao tumor, controlando ou induzindo a progressão do tumor em função da produção de citocinas distintas.

Estudos recentes têm demonstrado que a naltrexona em baixas doses possui a capacidade de atuar no sistema imunológico, auxiliando na profilaxia de distúrbios imunológicos secundários às doenças (CABALLERO-HERNÁNDEZ et al., 2005; MANNELLI et al., 2007). O tratamento com NDB pode atuar na promoção da ligação social, bem-estar emocional, diminuição do estresse e ansiedade, melhoria de problemas psiquiátricos, tais como depressão e autismo (BROWN; PANKSEPP, 2009).

Contudo, cabe ressaltar que altas doses de naltrexona bloqueiam completamente os receptores das endorfinas e encefalinas, enquanto que baixas doses provocam o aumento da produção destes elementos, permanecendo elevados durante todo o dia (ZAGON; MCLAUGHLIN, 2005). Um estudo realizado com camundongos transplantados com neuroblastoma administrando naltrexona em altas e baixas doses, concluíram que em animais que receberam doses altas de naltrexona (10 mg/kg) produziu bloqueio por longo tempo de receptores opioides, facilitando o crescimento do tumor (ZAGON; MCLAUGHLIN, 1983). Em contraste, a administração da naltrexona em doses baixas (0,1 mg/kg) reduziu a incidência de neuroblastoma em 66%, retardou o desenvolvimento do tumor em 98% e promoveu sobrevida em mais de 36% dos animais tratados.

A naltrexona é contra-indicada em casos de hepatite aguda, insuficiência hepática, gestação e amamentação. Dentre os efeitos colaterais da naltrexona observado em pacientes humanos relata-se a letargia, tonturas, vômitos e diarreia, sendo pouco frequentes e limitados ao início do tratamento (METZE et al., 1999). A naltrexona em doses baixas administrada por via oral pode ser utilizada por longos períodos e não está associada a toxicidade por efeitos adversos (SMITH et al., 2011). Em estudo que utilizou NDB combinada com o quimioterápico cisplatina para supressão e inibição do câncer de ovário em células cultivadas *in vitro*, concluiu-se que

a mesma pode ser usada como tratamento isolado ou combinado com cirurgia e quimioterapia (DONAHUE et al., 2011).

Neste contexto, a naltrexona se apresenta como uma alternativa em protocolos terapêuticos adicionais ao tratamento cirúrgico que possam estimular essa resposta imune efetiva com conseqüente aumento da sobrevida e melhoria da qualidade de vida das cadelas com neoplasias mamárias.

### 3. HIPÓTESES

- Naltrexona em doses baixas associada à carboplatina em cadelas com carcinoma em tumor misto benigno promove aumento da efetividade dos linfócitos, com aumento das concentrações de linfócitos T CD8<sup>+</sup>;
- Naltrexona em doses baixas aumenta as concentrações séricas de beta-endorfina e meta-enkefalina, o que reflete na manutenção da qualidade de vida e aumento da sobrevida das cadelas com carcinoma mamário tratadas com quimioterapia;
- Naltrexona em baixas doses em cadelas provoca efeitos colaterais gastrointestinais;
- Naltrexona em doses baixas, quando utilizada como tratamento adjuvante, promove redução dos efeitos colaterais da carboplatina em cadelas com carcinoma mamário;
- Naltrexona em doses baixas auxilia na manutenção dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos em cadelas tratadas com carboplatina.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar a utilização da naltrexona em doses baixas (NDB) como método de tratamento adjuvante com carboplatina em cadelas com carcinoma em tumor misto benigno (CaTMB), submetidas à mastectomia, atendidas no HOSPMEV-UFBA no período de abril de 2013 a fevereiro de 2015.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Estudar o possível efeito da NDB sobre linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de cadelas com CaTMB, a partir da imunofenotipagem, por citometria de fluxo do sangue periférico;
- Estudar o possível efeito da NDB sobre os níveis séricos de beta-endorfina e meta-enkefalina pelo ELISA em cadelas com CaTMB;
- Comparar o efeito da NDB sobre a sobrevida de cadelas portadoras de carcinoma em tumor misto de moderado/alto grau com e sem metástase regional, tratadas com carboplatina adjuvante à cirurgia, a partir de acompanhamentos trimestrais até 12 meses após o procedimento cirúrgico;
- Avaliar a qualidade de vida das cadelas submetidas ao tratamento adjuvante, em comparação com cadelas tratadas pelo método convencional, sob a forma de questionário auto-explicativo;
- Associar os dados encontrados com as informações relatadas na literatura acerca do tratamento do câncer de mama da cadela, visando identificar e analisar possíveis efeitos colaterais da carboplatina com a utilização do NDB como tratamento adjuvante, observados no período pós-quimioterápico imediato e tardio com a utilização da carboplatina.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo ocorreu dentro das normas de uso e experimentação animal, com aprovação do Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMEVZ) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), sob protocolo de nº 10/2013 (Anexo 1).

### **5.1 Local de execução da pesquisa**

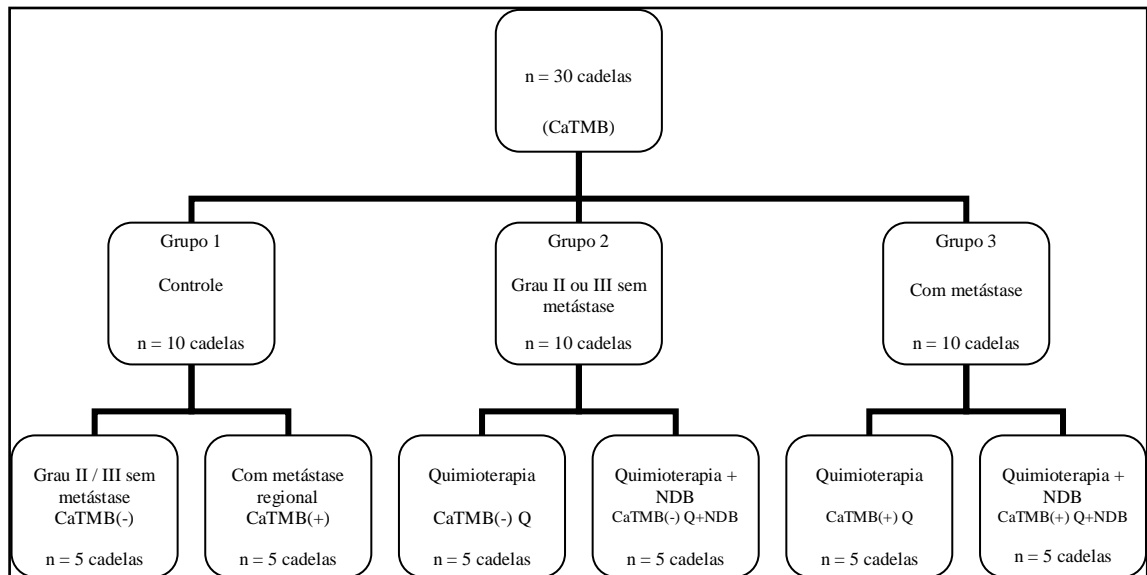
A pesquisa foi desenvolvida no Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato de Medeiros Neto (HOSPMEV/UFBA), na cidade de Salvador, Bahia e envolveu os seguintes setores: Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais, Diagnóstico por Imagem, Laboratório de Análises Clínicas e Laboratório de Patologia Veterinária. Como instituições parceiras, participaram da pesquisa o Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz (Belo Horizonte, Minas Gerais) e o Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral (ICB - UFMG).

### **5.2 Animais e grupos experimentais**

Dentre 75 animais avaliados, foram estudadas 30 cadelas de diferentes raças com idade variando entre cinco a 18 anos atendidas no HOSPMEV/UFBA no período de abril de 2013 a fevereiro de 2015, com diagnóstico histopatológico de CaTMB maiores que três centímetros.

As cadelas com CaTMB foram divididas em três grupos experimentais: Grupo 1: Controle, constituído por animais submetidos apenas a mastectomia, subdivididos em pacientes sem metástase (CaTMB(-)) e com metástase regional (CaTMB(+)); Grupo 2, todos sem metástase; e Grupo 3 todos com metástase. Os Grupos 2 e 3 ainda foram subdivididos de acordo com o tratamento em: tratados com quimioterapia (CaTMB(-) Q / CaTMB(+) Q) e tratados com quimioterapia e NDB (CaTMB(-) Q+NDB / CaTMB(+) Q+NDB), conforme demonstrado na Figura 2.





**Figura 2. Organograma dos grupos experimentais participantes da pesquisa.** Grupo 1 correspondente ao grupo controle, constituído por cadelas submetidas apenas a mastectomia, subdivididos em pacientes sem metástase (CaTMB(-)) e com metástase regional (CaTMB(+)). Grupo 2 composto por cadelas com CaTMB Grau II ou III sem metástase regional, subdivididas em tratamento com quimioterapia (CaTMB(-) Q) e tratados com quimioterapia e NDB (CaTMB(-) Q+NDB). Grupo 3 constituído por animais com CaTMB com metástase regional, subdivididas em tratamento com quimioterapia (CaTMB(+) Q) e tratados com quimioterapia e NDB (CaTMB(+) Q+NDB). Em todos os animais foi realizada inicialmente mastectomia.

## 5.3 Avaliação pré-operatória

### 5.3.1 Exame clínico

Todas as cadelas diagnosticadas com neoplasia mamária foram previamente submetidas ao exame que constou inicialmente de identificação do paciente e anamnese (Figura 3A). Em seguida, os animais foram submetidos ao exame físico completo, que consistiu na mensuração da frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura retal. A coloração da mucosa foi avaliada, associada ao tempo de preenchimento capilar e o estado de hidratação. Todos os sistemas foram avaliados, iniciando-se pela cabeça, passando pela região cervical, torácica e abdominal até chegar aos membros (Figura 3B).



**Figura 3. Avaliação clínica, mastectomia e procedimento quimioterápico em cadelas com carcinoma em tumor misto. A e B. Anamnese e exame físico em cadela com neoplasia mamária atendida no Hospital de Medicina Veterinária da UFBA. C e D. Procedimento cirúrgico (mastectomia radical unilateral) com retirada dos linfonodos inguinais em cadela com tumor mamário. E e F. Cadelas com CaTMB submetida ao tratamento quimioterápico com carboplatina endovenosa.**

No exame específico das glândulas mamárias, foi realizada a palpação de toda cadeia mamária, assim como dos linfonodos inguinais e axilares, com consequente mapeamento dos nódulos transcritos na ficha de avaliação oncológica específica (Anexo 2). Ademais, foi realizado o estadiamento clínico da neoplasia mamária, com base no tamanho do tumor (T), envolvimento neoplásico de linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M), de acordo com o sistema TNM (modificado de Owen, 1980) (Anexo 3).

Os tumores foram mensurados em pelo menos duas dimensões. Quando o animal apresentou mais de um nódulo, cada um deles foi medido separadamente, sendo considerada para a realização do estadiamento clínico a maior medida do tumor invasivo conforme critérios adotados pelo sistema TNM.

#### **5.4 Exames complementares**

Após a finalização da avaliação clínica pré-operatória, o sangue periférico foi colhido para realização de hemograma e perfil bioquímico sérico (uréia, creatinina, FA, ALT, cálcio e glicose), como avaliação geral pré-operatória. Por conseguinte, as cadelas foram encaminhadas para realização de radiografia simples de tórax em três incidências (lâtero-lateral direita (LLD), lâtero-lateral esquerda (LLE) e ventro-dorsal (VD)) para pesquisa de metástase pulmonar e linfadenomegalia, além da ultrassonografia de abdômen total para verificação de metástase abdominal.

#### **5.5 Procedimento cirúrgico e avaliação pós-operatória**

No pré-operatório, os animais foram submetidos a jejum alimentar de 8 horas e hídrico de 2 horas. O protocolo anestésico adotado foi cloridrato de morfina a 1% na dose de 0,5 mg/kg via intramuscular, seguido após 15 minutos por cloridrato de clorpromazina a 0,5% na dose de 0,5 mg/kg via endovenosa, como medicações pré-anestésicas. A indução anestésica foi feita com propofol a 1% na dose de 4 mg/kg via

endovenosa, e mantida com isoflurano em circuito circular valvular com absorvedor. Foi aplicado como antibiótico, a cefalotina (Cefalotina sódica<sup>®</sup> 1g – ABL - São Paulo) 30 mg/kg via endovenosa, e anti-inflamatório o meloxicam (Maxicam<sup>®</sup> 2% - Ourofino – São Paulo) 0,2 mg/kg via endovenosa, ambos administrados trinta minutos antes do procedimento cirúrgico.

Após tricotomia e anti-sepsia da região abordada, os animais foram posicionados na mesa cirúrgica em decúbito dorsal. O tipo de abordagem cirúrgica realizada foi a mastectomia radical unilateral com a retirada dos linfonodos inguinais em todos os casos (Figuras 3C e 3D). Os cuidados pós-operatórios imediatos constaram de analgesia à base de cloridrato de tramadol a 5% (Cristália - São Paulo) 3 mg/kg, via subcutânea e recuperação da temperatura corporal com aquecimento.

Após a cirurgia e adequada recuperação anestésica, com retorno da temperatura corporal normal, os animais foram liberados para os cuidados pós-operatórios em casa ou para internamento em clínica veterinária particular. Os animais foram alimentados com ração comercial balanceada e água *ad libitum*. Os cuidados pós-operatórios constaram de cloridrato de ranitidina, na dose de 2 mg/kg via oral, cada 12 horas, por 10 dias, cefalexina, na dose de 30 mg/kg via oral, cada 12 horas, por 10 dias, meloxicam, na dose de 0,1 mg/kg via oral, cada 12 horas, por quatro dias, cloridrato de tramadol, na dose de 3 mg/kg via oral, cada 8 horas, por cinco dias, dipirona, na dose de 25 mg/kg via oral, cada 8 horas, por sete dias.

Durante o período pós-operatório as cadelas foram acompanhadas com utilização de bandagem compressiva por 48 horas. Todos os animais fizeram uso de roupa pós-cirúrgica até a retirada dos pontos de pele. Neste período, foram avaliados parâmetros fisiológicos, de comportamento e as possíveis complicações da ferida cirúrgica. Após 10 dias do procedimento cirúrgico, os pontos de pele foram retirados e os pacientes do Grupo 2 e 3 foram encaminhados para tratamento quimioterápico. Já nas cadelas integrantes do Grupo 1 (controle) procedeu-se o seguimento para avaliação da sobrevida global.

## 5.6 Biópsia Excisional e Análise Histopatológica

O processamento e avaliação histopatológica foram realizados no Laboratório de Patologia Veterinária HOSPMEV/UFBA.

Após a finalização do procedimento cirúrgico, a cadeia mamária afetada, incluindo pele, tecido subcutâneo e linfonodos regionais, foram colocados em recipientes com formol e encaminhados ao setor de Patologia Veterinária para caracterização macro e microscópica. Os fragmentos colhidos foram coletados em frasco identificado contendo formol neutro e tamponado com fosfato a 10% e processado pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Concluída a etapa de processamento da amostra, os cortes histológicos medindo 4µm foram corados pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (H.E.) e analisados em microscópio óptico convencional.

As neoplasias foram classificadas microscopicamente de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors realizado por Cassali e colaboradores (2014). Para a graduação histopatológica foi utilizado o grau histológico de Nottingham (RICHARDSON modificado por ELSTON-ELLIS, 1993), que inclui: percentual de diferenciação tubular, avaliação do pleomorfismo nuclear e índice mitótico (ELSTON e ELLIS, 1993). Foram utilizadas as áreas de invasividade dos CaTMB para classificá-los em Grau I, Grau II e Grau III. Os tumores Grau I sem metástase foram excluídos do estudo.

## 5.7 Ensaio de imunofenotipagem no contexto *ex vivo*

Para avaliação da resposta imune celular, foram colhidos em dois momentos distintos 4 mL de sangue de todos os animais. Estas colheitas foram realizadas 50 minutos antes do procedimento cirúrgico (mastectomia) e seis meses após o procedimento cirúrgico. O sangue foi colhido em seringas descartáveis estéreis de 5 mL, através de venopunção da jugular, e em seguida transferido para tubos estéreis contendo EDTA, que foram mantidos a temperatura ambiente. Os parâmetros

hematológicos e imunofenotípicos foram avaliados por um analisador automático de células do sangue (ADVIA<sup>®</sup> 60, Bayer HealthCare, Tarrytown, NY, EUA) e um citômetro de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), respectivamente.

Para a realização dos ensaios de imunofenotipagem das células obtidas a partir do sangue periférico de cadelas foram utilizados anticorpos monoclonais que permitiram a marcação das seguintes populações celulares: anti CD3<sup>+</sup> para marcação de linfócitos T e anti CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> para as subpopulações de linfócitos T. Os anticorpos possuíam marcação com fluorocromos FITC (Isotiocianato de fluoresceína - emitiam fluorescência tipo 1 -FL1), R-PE (Ficoeritrina – emitiam fluorescência tipo 2 - FL2) e PE-Cy-5 (ficoeritrina conjugada com cianina - emitiam fluorescência tipo 3 - FL3). Todos os anticorpos monoclonais foram produzidos pela SEROTEC Ltd. (Oxford - England).

Os anticorpos monoclonais foram diluídos em PBS-W [solução salina tamponada com fosfato-PBS = 0,15M, 8 g/l de NaCl, 2 g/l de KCl, 2 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1,15 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2 com 0,5% de albumina bovina sérica (BSA) e 0,1% de azida sódica] em diluições e combinações previamente estabelecidas na padronização dos protocolos descritos por Araújo et al. (2008) e Estrela-Lima e colaboradores (2012).

Em um tubo cônico de poliestireno medindo 12x75 milímetros (FALCON<sup>®</sup> – BECTON DICKINSON, San Jose, CA, EUA) foram adicionados 40 µL de sangue total contendo EDTA e 0,25 µL de CD3<sup>+</sup> (FITC) + 0,25 µL de CD4<sup>+</sup> (R-PE) + 1 µL CD8<sup>+</sup> (Cy-5). A amostra de sangue periférico foi homogeneizada cuidadosamente e incubada em temperatura ambiente, durante 30 minutos, ao abrigo da luz. Em seguida, as hemácias foram lisadas adicionando-se 3 mL de solução de lise (FACS LISYNG SOLUTION – BECTON DICKINSON, San Jose, CA, EUA), sob agitação no vórtex. A suspensão celular permaneceu em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz; após este período a mesma foi centrifugada a 400 x g por sete minutos, a temperatura ambiente.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado vertendo-se o tubo e as células foram então, homogeneizadas no vórtex a baixa velocidade. Foram adicionados 3 mL de PBS-W e a suspensão celular foi submetida novamente a centrifugação a 400 x g, por sete minutos a temperatura ambiente, sendo novamente desprezado o sobrenadante e, o sedimento ressuspenso e homogeneizado cuidadosamente; esta última lavagem foi repetida mais uma vez. As células foram fixadas com 100 µL de solução fixadora para citometria – MaxFacsFix (MFF) (10,0 g/l de paraformaldeído, 10,2 g/l de cacodilato de sódio e 6,65 g/l de cloreto de sódio, pH 7,2) e submetidas à leitura no citômetro de fluxo, com avaliação de 10 mil eventos. Os controles negativos foram anticorpos obtidos da empresa correspondente apresentando mesmo isótipo e produzidos na mesma espécie.

Após todo o procedimento de marcação da fenotipagem, as amostras foram analisadas no citômetro FACScalibur (BECTON DICKINSON, San Jose, CA, EUA), acoplado a um sistema de computador com programa específico (CELL QUEST®). A caracterização fenotípica, por citometria de fluxo, inclui a análise básica de três parâmetros celulares: tamanho (determinado pela difração do raio laser – “Forward scatter” - FSC), granulosidade ou complexidade interna (determinada pela refração e reflexão do raio laser – “Side Scatter” - SSC) e intensidade relativa de fluorescência.

A obtenção dos dados por citometria teve início com a identificação da população celular de interesse (R1), após ajustes de ganho de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e/ou fluorescências (FL1, FL2 e FL3). Com a seleção da região de interesse (R1), foi feita a análise dos aspectos fenotípicos considerando o percentual de células positivas expressas em gráficos de dispersão pontual de fluorescência, equivalente à população positiva para cada marcador avaliado.

A abordagem foi empregada para quantificar fenótipos celulares que apresentam distribuição bimodal, ou seja, caracterizadas por apresentarem populações positivas e negativas para o referido marcador fenotípico. Em todos os experimentos foram analisados para cada amostra os controles das reações, que são importantes para avaliação da qualidade do perfil celular e detecções de eventual ocorrência de fluorescências inespecíficas.

## 5.8 Dosagem sérica das concentrações de beta-endorfina

Para a dosagem de beta-endorfina foi utilizado um kit ELISA padrão de beta-endorfina canino (MyBioSource, San Diego, CA, EUA). O sangue foi colhido, em seringas descartáveis estéreis de 5 mL, através de venopunção da jugular, e em seguida transferido para tubos estéreis sem anticoagulante, que foram mantidos a temperatura ambiente. Estas colheitas foram realizadas 50 minutos antes do procedimento cirúrgico (mastectomia) e seis meses após o procedimento cirúrgico. Após a coagulação das amostras durante o período de duas horas, foi realizada a centrifugação utilizando 3000 rpm durante 15 minutos. A partir daí, o soro obtido foi armazenado a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior realização das dosagens séricas de beta-endorfina e meta-enkefalina.

Foi utilizada uma placa sensibilizada de 96 poços, preenchida com 100  $\mu\text{L}$ /poço com anticorpo de captura para beta-endorfina (cão) e deixada à temperatura ambiente por 24 horas. No dia seguinte, a placa foi lavada por três vezes com tampão de lavagem apropriado e então foi adicionado 300  $\mu\text{L}$ /poço de tampão de bloqueio em cada poço. A placa foi incubada com este tampão por 1 hora à temperatura ambiente para bloqueio de sítios de ligação inespecíficos. Após este procedimento, a placa foi novamente lavada e acrescido 100  $\mu\text{L}$ /poço das amostras de soro (diluídas 1:2) e soluções padrão diluídas em sete concentrações (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2  $\text{pg}/\mu\text{L}$ ). A placa foi incubada à temperatura ambiente por uma hora.

Após este período, a placa foi lavada como descrito anteriormente e adicionados 100  $\mu\text{L}$ /poço de anticorpo anti-beta-Endorfina biotilado (50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , Bachem Inc.), procedendo a incubação à temperatura ambiente por mais duas horas. Em seguida, a placa foi novamente lavada, acrescentando-se a solução de estreptoavidina (1:200) 100  $\mu\text{L}$ /poço e por 1 hora. Após nova lavagem, 100  $\mu\text{L}$  de solução para substrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$  e TMB – tetrametilbenzidina) foram adicionados. A placa foi mantida no escuro por aproximadamente 10 minutos para o desenvolvimento de cor e em seguida a reação colorimétrica foi interrompida a partir da adição de ácido clorídrico (2M – 100  $\mu\text{L}$ /poço). A leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm com filtro de correção de 540 ou 570 nm. A



concentração sérica de beta-endorfina para cada amostra foi esquematizada a partir da curva-padrão de regressão linear, sendo calculada em pg/ml.

### **5.9 Dosagem sérica das concentrações de meta-encefalina**

Para a dosagem de meta-encefalina foi utilizado um kit ELISA específico de meta-encefalina canino (MyBioSource, San Diego, CA, EUA). Inicialmente as amostras de soro foram colocadas na placa pré-revestida e incubadas por uma hora, juntamente com o conjugado Met-ENK-HRP. Após o período de incubação, os poços foram decantados e lavados cinco vezes. Em seguida, os poços foram incubados com um substrato para a enzima HRP. O produto da reação enzima-substrato formou um complexo de cor azul. Finalmente, uma solução de parada foi adicionada, e assim a solução se transformou na cor amarela.

A intensidade da cor foi medida por espectrofotômetro a 450 nm em um leitor de microplacas, em que esta intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração de Met-ENK. Uma curva padrão relativa à intensidade da cor foi traçada para determinação da concentração de meta-encefalina. A concentração sérica de meta-encefalina para cada amostra foi esquematizada a partir da curva-padrão de regressão linear, sendo calculada em ng/ml.

### **5.10 Tratamento com Naltrexona**

Após a recuperação cirúrgica, com completa cicatrização por primeira intenção e retirada dos pontos, ou seja, 20 dias após o procedimento cirúrgico, foi iniciado o tratamento com naltrexona em doses baixas (NDB), 0,1 mg/kg, via oral, a cada 24 horas, durante 24 semanas.

Esta medicação foi manipulada sob a forma de cápsula e administrada ao animal, pelo responsável, sempre pela noite. Nenhum dos responsáveis sabia da finalidade desta medicação, sendo caracterizado como estudo cego. A cada sete dias as

cadelas foram avaliadas clinicamente, com o objetivo de verificar possíveis efeitos colaterais da medicação, como letargia e distúrbios gastrointestinais (vômitos e diarreia).

### **5.11 Quimioterapia com carboplatina**

Cerca de vinte dias após o procedimento cirúrgico, foram iniciadas as sessões de quimioterapia utilizando a carboplatina endovenosa, na dosagem de 300 mg/m<sup>2</sup>, com tempo de infusão de cinco minutos, sendo um ciclo totalizando seis sessões com intervalos de 21 dias (Figuras 3E e 3F). Aproximadamente 24 horas antes do início de cada sessão de quimioterapia, foram realizados hemograma e bioquímica sérica (uréia, creatinina, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, cálcio e glicose) para a avaliação do estado geral do paciente, que foram repetidos também com sete e 14 dias após a administração do quimioterápico. No protocolo para a quimioterapia, as cadelas foram submetidas à fluidoterapia endovenosa com solução fisiológica quatro horas antes e quatro horas após a administração da carboplatina, além da aplicação de metoclopramida (0,5 mg/kg), ranitidina (2 mg/kg) e prometazina (0,1 mg/kg), todos por via subcutânea. Os mesmos medicamentos foram ainda prescritos, via oral, por três dias consecutivos.

A carboplatina foi manipulada previamente em uma capela de exaustão e sua administração no animal foi realizada em uma sala exclusiva, por um Médico Veterinário adequadamente paramentado com avental descartável, luvas, gorro e máscara, de acordo com as normas de biossegurança. Ao final do procedimento, os resíduos foram descartados separadamente, seguindo o padrão preconizado para produtos contaminados com agentes antineoplásicos.

### 5.12 Acompanhamento e sobrevida

Para o acompanhamento dos pacientes foram realizados exames clínicos e laboratoriais (hemograma e bioquímica sérica – uréia, creatinina, fosfatase alcalina e alanina amino transferase, cálcio e glicose), além de radiografia simples de tórax a cada três meses. Este acompanhamento foi realizado por um período de até dois anos após o procedimento cirúrgico, objetivando a avaliação da sobrevida global. O tempo de sobrevida global foi definido (em dias) como sendo o período entre a exérese cirúrgica do tumor primário e a data do óbito pela doença.

As pacientes que evoluíram para óbito durante o período de acompanhamento, foram necropsiadas no Setor de Patologia Veterinária/HOSPMEV-UFBA para determinação da *causa mortis* e detecção de possíveis metástases (Anexo 4). Foram colhidos fragmentos de todos os órgãos, com indicação macroscópica de metástases, para avaliação histopatológica. Os fragmentos foram coletados em frasco identificado contendo formol neutro e tamponado com fosfato a 10% e processado pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Concluída a etapa de processamento da amostra, os cortes histológicos medindo 4 µm foram corados pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina e analisados em microscópio óptico convencional. As necropsias foram realizadas após autorização dos proprietários por escrito em formulário específico (Anexo 5).

### 5.13 Avaliação da qualidade de vida

Durante o período da quimioterapia e nos acompanhamentos trimestrais, foi realizada a avaliação da qualidade de vida em todas as cadelas que participaram do presente estudo. Um questionário foi entregue ao guardião responsável pelo animal para preenchimento imediato, não sabendo o que estava sendo avaliado. A aplicação do questionário foi feita a cada 15 dias, durante o período de quimioterapia e acompanhamento.

O questionário foi desenvolvido a partir do proposto por Yazbek e Fantoni (2005) para avaliação da qualidade de vida relacionada à saúde em cães com dor crônica secundária ao câncer, sendo composto de 12 questões com quatro alternativas possíveis de resposta, em que cada questão variou de zero a três pontos, alcançando um total de 36 pontos. A pontuação zero é considerada a pior qualidade de vida e 36 a melhor. As questões abrangem informações sobre comportamento, interação com o proprietário e avaliação da dor, apetite, distúrbios do sono, presença de vômitos, diarreia, incontinência ou repleção urinária (Anexo 6).

#### **5.14 Análise estatística**

Os dados foram agrupados da seguinte forma: tamanho do tumor (3 - 5 cm ou > 5 cm), metástase para linfonodos (sim ou não), estadiamento clínico (II, III, IV ou V), graduação histológica (II ou III), utilização da quimioterapia com carboplatina (sim ou não), escore corporal (obeso, normal, magro), tratamento auxiliar com NDB (sim ou não), percentual de linfócitos CD4<sup>+</sup> (baixo ou alto), percentual de linfócitos CD8<sup>+</sup> (baixo ou alto), razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (baixa ou alta), escore de qualidade de vida (baixo e alto), taxa de sobrevida (baixa: menor que 180 dias/seis meses e alta: maior que 180 dias/seis meses).

Inicialmente, para avaliação da normalidade da distribuição, os dados foram submetidos a teste de Kolmogorov-Smirnov. Para os dados paramétricos e não paramétricos foram utilizados o teste t de Student / Mann-Whitney U (comparação de dois grupos) e ANOVA / Teste de Kruskal-Wallis (mais de dois grupos), respectivamente. Da mesma forma, possíveis correlações foram investigadas pelos testes de Spearman. As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox) e Cox na análise univariada ou multivariada, respectivamente.

Todos os fatores prognósticos foram analisados de forma multivariada por meio de análise de agrupamentos hierárquica, análise de agrupamentos não-hierárquica e análise de componentes principais. Em todos os casos, valor de  $p < 0,05$  foi

considerado estatisticamente significativo. As análises foram realizadas utilizando o softwares Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA) e SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Características clínicas e patológicas

Foram utilizadas no estudo 30 cadelas com diagnóstico histopatológico de carcinoma em tumor misto benigno (Anexo 7). A idade das cadelas variou entre cinco a 18 anos, com maior frequência de animais entre 10 e 14 anos (60%) (Tabela 1). Constatou-se, ainda, que os tumores de mama acometem animais de todos os portes, predominantemente cães da raça Poodle 50% (15/30), seguida por cães sem raça definida (SRD) 20% (6/30) (Tabela 2).

**Tabela 1.** Idade das 30 cadelas atendidas durante o estudo

<b>Idade</b>	<b>Número de cadelas</b>	<b>%</b>
5 a 9 anos	9	30
10 a 14 anos	18	60
15 a 18 anos	3	10
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>100</b>

**Tabela 2.** Distribuição racial das 30 cadelas atendidas durante o estudo

<b>Raça</b>	<b>Número de cadelas</b>	<b>%</b>
Sem raça definida	6	20
Pastor Alemão	3	10
Poodle	15	50
Cocker Spaniel	3	10
Pinscher	3	10
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>100</b>

Na anamnese foi observado que apenas 30% (9/30) dos proprietários alimentavam as cadelas exclusivamente com ração industrializada. A maioria - 70% (21/30) - relatou inserir ou ter como base a comida caseira na dieta de seus animais. Apenas 10% (3/30) das cadelas apresentavam-se magras, 70% (21/30) dentro dos parâmetros de normalidade e 20% (6/30) obesas. A maioria das cadelas estudadas apresentou condição corporal dentro da normalidade.

Com base no histórico reprodutivo dos animais pesquisados, verificou-se que 20% (6/30) já apresentaram pseudogestação, sendo esta a alteração mais frequentemente observada. Em 30% (9/30) do total de casos os proprietários admitiram a utilização de progestágeno, mas não sabiam informar com exatidão a sua frequência e dosagem.

A análise dos dados observados indica a predominância de tumores multicêntricos em 80% (24/30) dos casos, com comprometimento bilateral da cadeia mamária em 70% (21/30) das pacientes, sendo as mamas inguinais e abdominais mais frequentemente acometidas, em 50% (15/30) e 30% (9/30) respectivamente. Em contrapartida, a ocorrência de tumor mamário apenas nas mamas torácicas representou apenas 20% (6/30) do total dos animais. Neste trabalho, os animais com tumores em estágio avançado de crescimento (maiores que 5 cm) representaram 70% (21/30) dos casos, enquanto tumores com diâmetro de 3 a 5 cm representaram 30% (9/30).

Com relação à quimioterapia, 90% (18/20) das cadelas fizeram as seis sessões de quimioterapia, completando o ciclo previsto. 10% (2/20) que evoluíram para óbito após a quarta sessão de quimioterapia. Dentre os possíveis efeitos colaterais da quimioterapia, 10% (2/20) das cadelas apresentaram vômitos logo após cada sessão de quimioterapia e 5% (1/20) a diarreia. Cabe ressaltar que os animais que apresentaram estes efeitos colaterais não foram submetidos ao tratamento com naltrexona (NDB).

Com base nos parâmetros hematológicos, anemia e leucopenia foram os achados mais importantes, observados tanto no grupo controle quanto no grupo submetido ao tratamento quimioterápico sem NDB. Em contrapartida, nos dois subgrupos tratados com NDB os animais mantiveram número de hemácias, leucócitos e plaquetas dentro dos limites da normalidade para a espécie. As medianas e semi-

intervalos entre quartil obtidas a partir dos parâmetros hematológicos são descritas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Parâmetros hematológicos em cadelas com carcinoma em tumor misto benigno, divididos em antes e após o tratamento

Parâmetros hematológicos	Antes						
	Controle		CaTMB(-)		CaTMB(+)		
	CaTMB(-)	CaTMB(+)	Q	Q+NDB	Q	Q+NDB	
Hemácias <sup>a</sup>	6,5±1,1	7,3±0,6	7±0,7	6,4±0,7	7,2±1,6	6±0,7	
Plaquetas <sup>b</sup>	288±242,5	325±83	393±94,7	500±115,2	396±110,7	289±65,7	
Leucócitos <sup>c</sup>	Total	18.1±4.4	12±3.4	10.8±4	14.9±6.4	8.3±1.5	14.2±5
	Bastonetes	0±368	0±45	0±27	0±461	0±27	0±147
	Segmentados	11.8±4.6	8.7±3.1	8.9±3.5	8.3±3.9	5.9±0,9	10.7±4.5
	Eosinófilos	0,7±0,5	0,7±0,4	0,7±0,4	0,5±0,2	0,2±0,4	0,8±0,2
	Monócitos	0,9±0,4	0,6±0,1	0,4±0,5	0,8±1	0,4±0,2	0,4±0,3
	Linfócitos	1.5±1.3	1.4±0.2	1.7±1.3	1.2±0.5	1.5±0.7	1.7±0.7
Parâmetros hematológicos	Depois						
	Controle		CaTMB(-)		CaTMB(+)		
	CaTMB(-)	CaTMB(+)	Q	Q+NDB	Q	Q+NDB	
Hemácias <sup>a</sup>	4.4±0.6*	3.7±1.2*	3.9±0.7*	6.5±0,5	3.9±1.3*	6.7±0,5	
Plaquetas <sup>b</sup>	212±76.7	170±125	48±22.3*	280±95.5	25±29.5*	364±136.5	
Leucócitos <sup>c</sup>	Total	25±7.2	32.9±6.1*	2.6±0.27*	6±0,45	1.4±1.3*	6.3±2.77
	Bastonetes	500±136	500±429*	0±18	0±52,2	0±131	0±60
	Segmentados	14.7±3.9	1.9±5.3*	3.5±1.2*	5.3±1.7	0,9±5.7	6±2.3
	Eosinófilos	0,8±0,3	2±0,8	0,07±0,1*	0,4±0,2	0,05±0,06*	0,3±0,2
	Monócitos	0,7±0,7	1,2±0,2	0,07±0,1*	0,1±0,2	0,03±0,01*	0,1±0,2
	Linfócito	2.4±0.5	2.5±2.4	0.8±0.7	1.9±0.5	0.2±0.4	1.7±0.3

a Hemácias são expressadas como número x 10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup> de sangue.

b Plaquetas são expressadas como número x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup> de sangue.

c Subpopulações de células sanguíneas brancas são expressadas como número x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup> de sangue.

\*Diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

Antes do procedimento cirúrgico, não foi observada anormalidades no perfil bioquímico sérico das pacientes. Durante os acompanhamentos e ao final do experimento as concentrações séricas de uréia, ALT, FA, cálcio e glicose foram semelhantes ( $p < 0,05$ ) e estiveram dentro dos valores de referência em todas as cadelas. No entanto, os valores da creatinina foram superiores ( $p < 0,05$ ) no grupo controle. Os valores medianos e os semi-intervalos entre quartil para os parâmetros bioquímicos séricos de uréia, creatinina, ALT, FA, cálcio e glicose estão descritos na Tabela 4.



**Tabela 4.** Parâmetros bioquímicos séricos em cadelas com carcinoma em tumor misto benigno, divididos em antes e após o tratamento

Parâmetros bioquímicos	Antes					
	Controle		CaTMB(-)		CaTMB(+)	
	CaTMB(-)	CaTMB(+)	Q	Q+NDB	Q	Q+NDB
Uréia <sup>a</sup>	49,1±23,7	42,6±6,4	42,2±5,8	44,7±10,7	41±0,9	54±10,4
Creatinina <sup>a</sup>	1±0,22	0,9±0,2	1±0,07	0,9±0,15	1±0,05	1±0
ALT <sup>b</sup>	44,9±10	42,3±23,7	33±23,4	28,8±5,25	58±42,8	51,2±14
FA <sup>b</sup>	159,2±47,1	183,8±92,3	160±65,2	119,4±35,9	160±50,6	159,2±94,1
Cálcio <sup>a</sup>	12±2,6	13,3±2,2	13,2±2,6	13±3,4	14,4±16,5	9±2,9
Glicose <sup>a</sup>	85±5,9	87±15,6	83±11,5	87±16,3	104,8±29,2	73,5±34
Parâmetros bioquímicos	Depois					
	Controle		CaTMB(-)		CaTMB(+)	
	CaTMB(-)	CaTMB(+)	Q	Q+NDB	Q	Q+NDB
Uréia <sup>a</sup>	33±8,8	45,2±0,3	45,2±0,3	45,2±0,7	45,3±0,7	45,2±3,4
Creatinina <sup>a</sup>	1,±0,15	<u>1,4±0,2*</u>	1±0,35	1,1±0,1	1±0,1	1±0,1
ALT <sup>b</sup>	51±33,2	29,2±1,6	29,2±1,6	27,6±0,8	29,2±2	29,2±17,6
FA <sup>c</sup>	125,8±57,6	112,9±17,8	125,8±16,8	99,9±12,9	99,9±16,9	99,9±16,9
Cálcio <sup>a</sup>	9,7±0,9	9±0,6	9±0,5	10,4±0,7	9,7±0,7	9±0,7
Glicose <sup>a</sup>	90±8,2	87±6,5	87±9	110±11,5	100±11,5	100±11,5

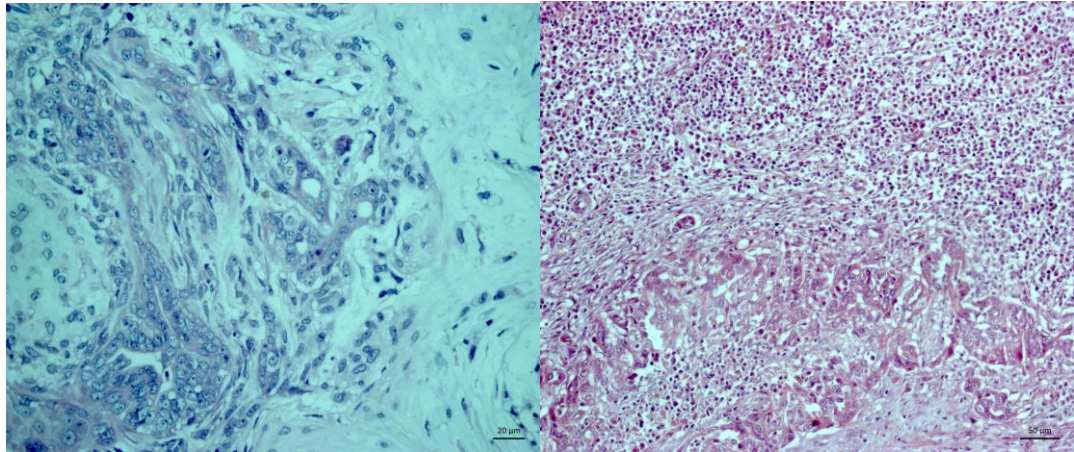
a Uréia, creatinina, cálcio e glicose são expressados como mg/dL de sangue.

b ALT é expressada como UI/dL de sangue.

c FA é expressada como U/dL de sangue.

\*Diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

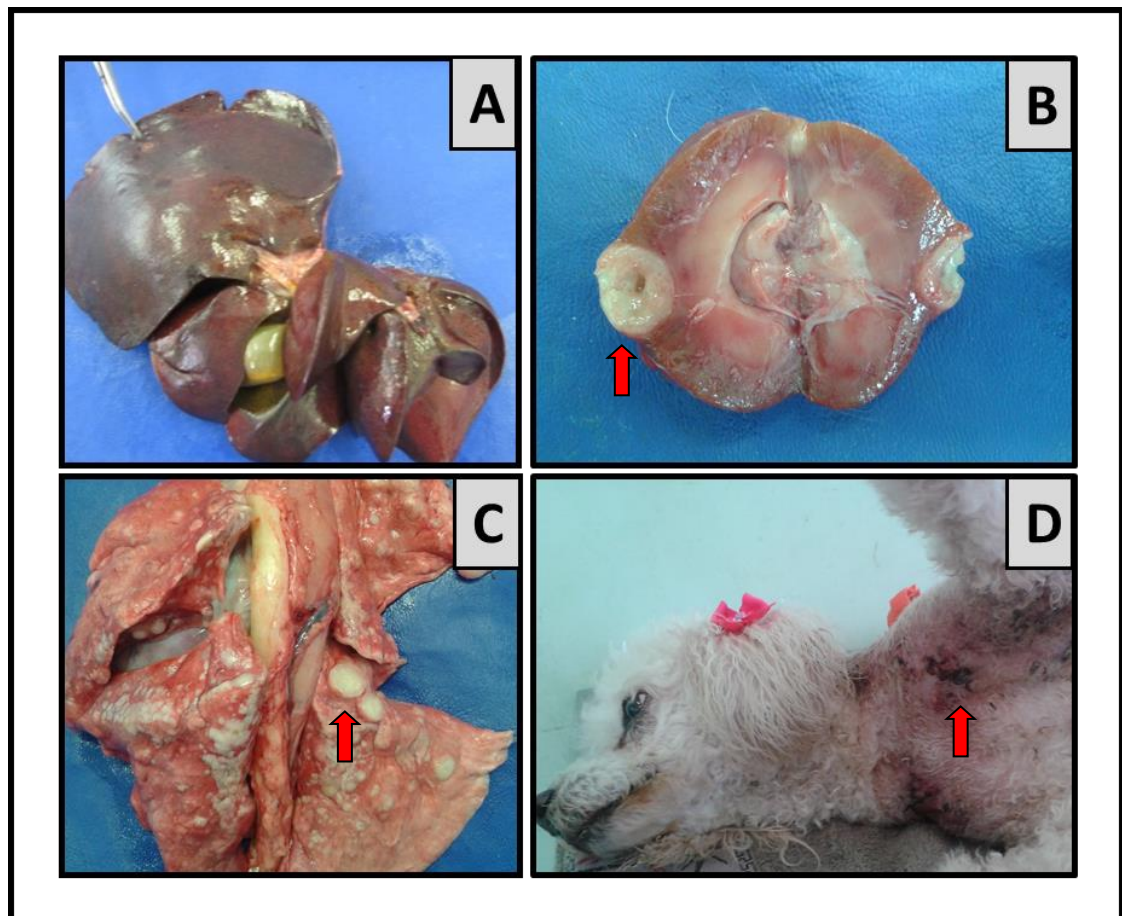
De acordo com a avaliação do estadiamento clínico, os animais do Grupo 2 e 3 foram inseridos no estadiamento III e IV, respectivamente. Para graduação histopatológica dos CaTMB foram utilizadas as áreas de invasividade dos tumores, sendo estes classificados em Grau I, Grau II e Grau III (Figura 4). Os tumores Grau I sem metástase foram excluídos do estudo.



**Figura 4. Fotomicrografia de carcinoma em tumor misto benigno (CaTMB) mamário canino. A.** CaTMB Grau II (HE, 40X). **B.** Metástase de CaTMB para linfonodo inguinal. (HE, 20X).

Dentre as 30 cadelas estudadas, houve óbitos apenas no grupo controle (6/10), CaTMB(+) Q (4/5) e CaTMB(-) Q (2/5), devido à evolução do processo neoplásico (metástases e síndromes paraneoplásicas, como ulceração gastroduodenal e caquexia), sendo o choque hipovolêmico a *causa mortis* mais frequente, seguido de insuficiência respiratória aguda e septicemia. Pode-se perceber que apenas nos subgrupos tratados com NDB não houve óbitos.

O exame necroscópico foi realizado em 12 cadelas com CaTMB e vários órgãos revelaram lesões sugestivas de metástases, sendo confirmado na microscopia que estas metástases eram compatíveis com o tumor primário. Os sítios de acometimento secundário e frequência foram: pulmão (9/12), pele (5/12), fígado (3/12) e rins (2/12) (Figura 5).



**Figura 5. Metástases de carcinoma em tumor misto de mama em cadelas. A. Nódulo neoplásico no fígado. B. Rins, infiltração neoplásica focal e delimitada. C. Pulmão, difuso acometimento neoplásico. D. Metástase em pele.**

## 6.2 Naltrexona

A naltrexona, no presente estudo, foi prescrita, de forma inédita, como tratamento adjuvante para 10 cadelas e, em nenhuma delas houve efeitos colaterais relacionados ao seu uso, tais como letargia, vômitos e diarreia, não sendo necessária a interrupção do tratamento. Ao contrário, as principais manifestações percebidas, em todas as cadelas, desde o início do tratamento com NDB e relatadas pelos proprietários por meio da anamnese realizada sempre antes de cada sessão de quimioterapia, foram a

disposição para brincadeiras, apetite e sociabilidade, demonstradas e quantificadas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Principais manifestações comportamentais relatadas pelos proprietários das 10 cadelas com CaTMB, tratadas com a NDB como método de tratamento adjuvante à quimioterapia

Comportamento	Aumentou		Inalterado		Diminuiu	
	Número (animais)	%	Número (animais)	%	Número (animais)	%
Apetite	7	70	3	30	0	0
Medo	0	0	3	30	7	70
Agressividade	0	0	2	20	8	80
Vocalização	0	0	4	40	6	60
Disposição para brincadeiras	8	80	2	20	0	0
Sociabilidade	10	100	0	0	0	0

A análise comparativa dos achados clínicos e patológicos entre cadelas não tratadas e tratadas com NDB são apresentados na Tabela 6 e foi significativamente associada com qualidade de vida, sobrevida e condição (vivo ou morto). Portanto, tais dados denotam que o tratamento adjuvante com NDB está relacionado com maior sobrevida e melhor qualidade de vida.

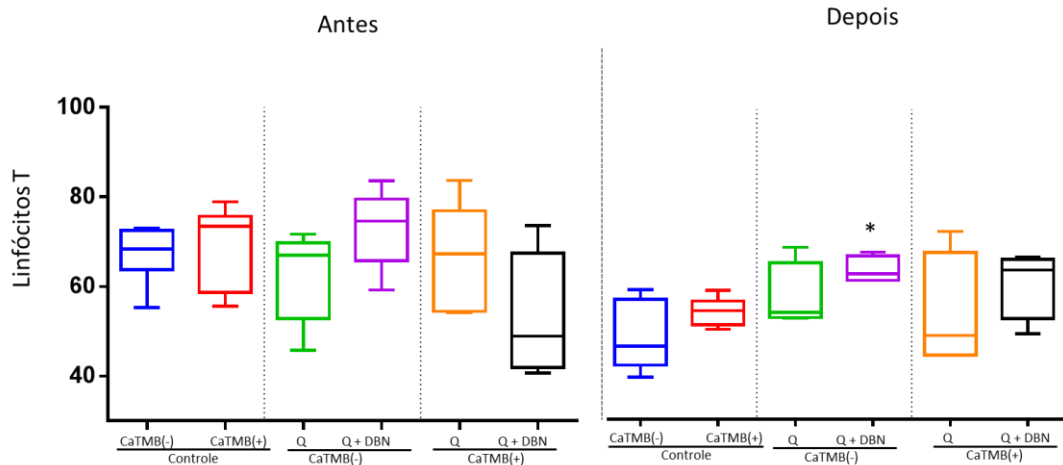
**Tabela 6.** Parâmetros clínicos e patológicos de cadelas com carcinoma em tumor misto benigno correlacionados com a ausência e presença do tratamento com NDB

<b>Parâmetros</b>	<b>NDB (-)</b>	<b>NDB (+)</b>	<b><i>p</i></b>
Graduação			
Grau II	8 (40%)	9 (45%)	0,531
Grau III	2 (10%)	1 (5%)	
Tamanho			
3 – 5cm	2 (10%)	3 (15%)	0,606
>5cm	8 (40%)	7 (35%)	
Linfonodo			
0	5 (25%)	5 (25%)	0,999
1	5 (25%)	5 (25%)	
Estadiamento			
3	4 (20%)	5 (25%)	0,452
4	4 (20%)	5 (25%)	
5	2 (10%)	0 (0%)	
Qualidade de vida			
0	7 (35%)	1 (5%)	0,006*
1	3 (15%)	9 (45%)	
Sobrevida			
Até 180 dias	7 (35%)	1 (5%)	0,006*
>180 dias	3 (15%)	9 (45%)	
Condição			
Vivo	1 (5%)	10 (50%)	0,000*
Morto	9 (45%)	0 (0%)	

\* Diferença significativa quando  $p < 0.05$ .

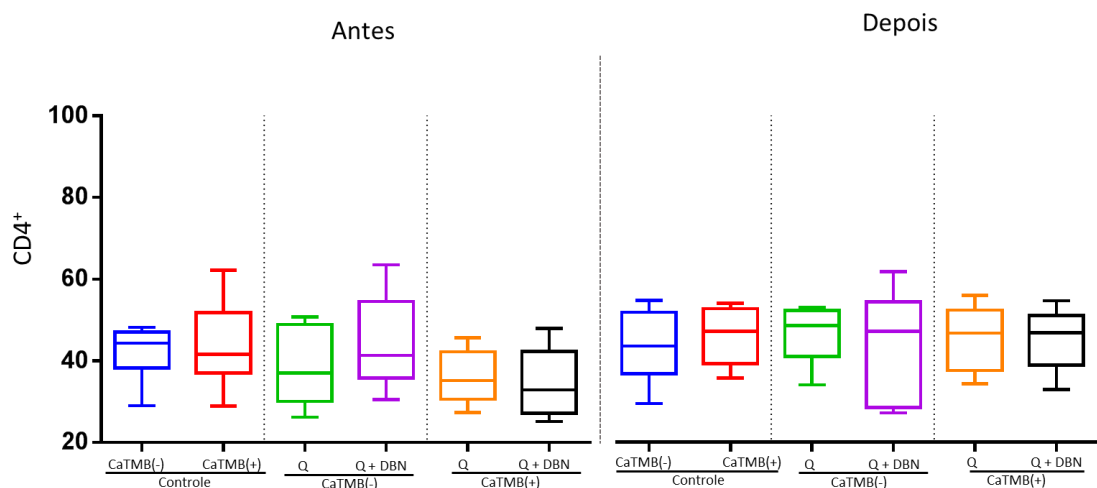
### 6.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo no sangue periférico

Antes do tratamento não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos no percentual de linfócitos T. Contudo, a análise pós tratamento revelou aumento significativo do percentual de linfócitos T no grupo CaTMB(-) Q+NDB em relação ao grupo tratado apenas com quimioterapia CaTMB(-) Q e o grupo controle CaTMB(-) (Figura 6). Estes resultados sugerem, quando se observa também uma tendência, ainda que não significativa, ao aumento do número de linfócitos no grupo CaTMB(+) Q+NDB, ou seja tratado com NDB mas com metástase.



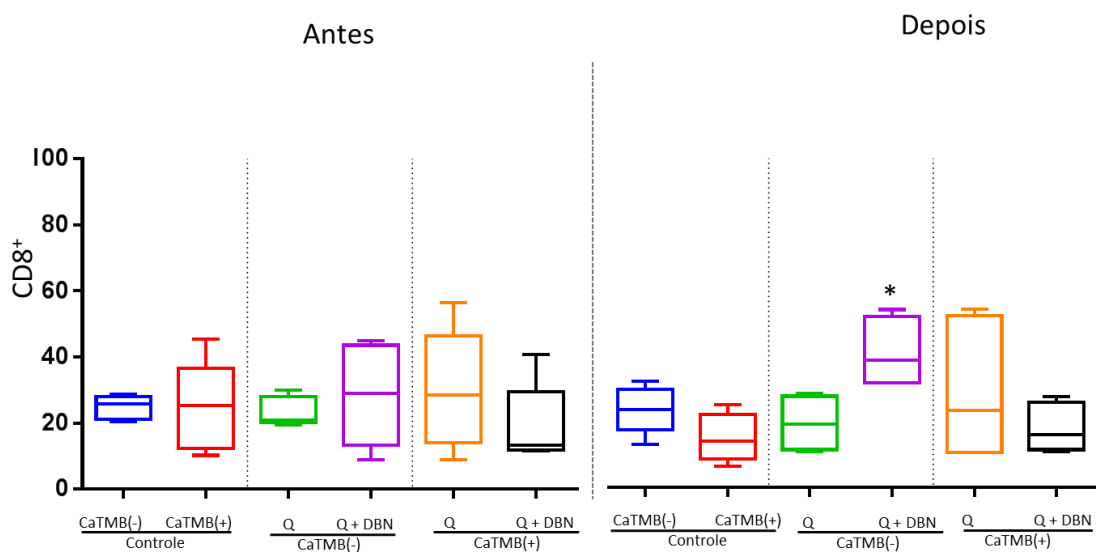
**Figura 6. Perfil imunofenotípico de linfócitos T circulantes no sangue periférico de cadelas com carcinoma em tumor misto benigno.** Análise de células T circulantes divididos em antes e após o tratamento estabelecido, mais subcategorizados de acordo com ausência (-) ou presença (+) de metástase para linfonodo. Diferenças significativas ocorre quando  $p < 0,05$ , sendo destacadas por \*.

As análises dos dados não demonstram diferenças significativas no percentual de linfócito T  $CD4^+$  entre os grupos (Figura 7), antes e após o tratamento.



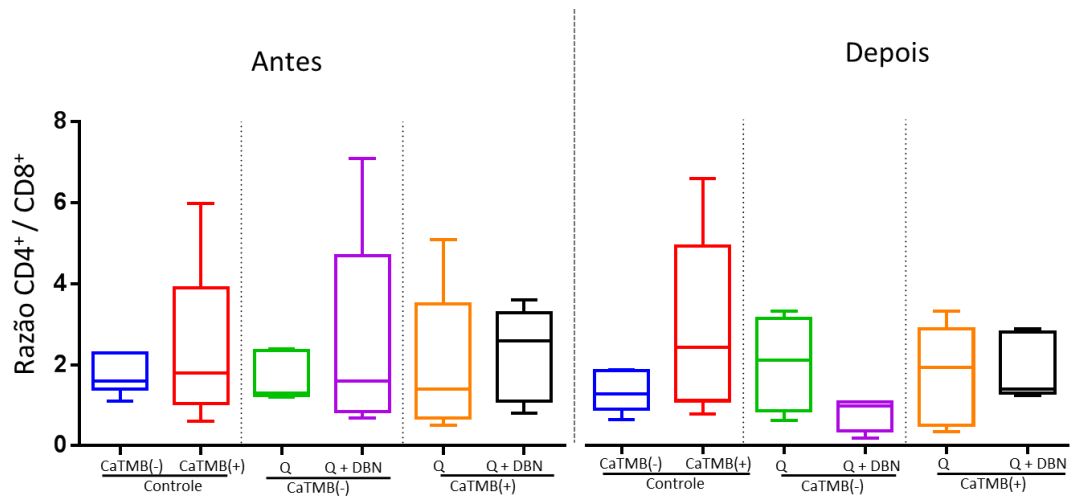
**Figura 7. Perfil imunofenotípico de linfócitos T  $CD4^+$  circulantes no sangue periférico de cadelas com carcinoma em tumor misto benigno.** Análise de células T  $CD4^+$  circulantes, antes e após o tratamento estabelecido subcategorizados de acordo com a ausência (-) ou presença (+) de metástase para linfonodo.

Não houve diferenças significativas na porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> entre os grupos no período inicial. Entretanto, diferente dos resultados observados para os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, a avaliação pós experimentação revelou percentual de linfócito T CD8<sup>+</sup> significativamente maior no grupo CaTMB(-) Q+NDB ( $p<0,05$ ), em comparação ao grupo tratado apenas com quimioterapia CaTMB(-) Q (Figura 8), sugerindo influência do NDB e status nodal (ausência de metástase) na resposta imune mediada por linfócitos T CD8<sup>+</sup>.



**Figura 8. Perfil imunofenotípico de linfócitos T CD8<sup>+</sup> circulantes no sangue periférico de cadelas com carcinoma em tumor misto benigno.** Análise de células T CD8<sup>+</sup> circulantes divididos em antes e após o tratamento estabelecido, mais subcategorizados de acordo com a ausência (-) ou na presença (+) de metástase para linfonodo. As populações de linfócitos CD8<sup>+</sup> foram identificadas por imunofenotipagem por citometria de fluxo. Diferenças significativas quando  $p<0,05$ , sendo destacadas por \*.

Não foram observadas diferenças significativas na razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> entre os grupos, antes e após o tratamento. Contudo, no grupo CaTMB(-) Q+NDB observa-se uma tendência a redução desta razão, certamente em virtude do significativo aumento de linfócitos CD8<sup>+</sup> observado neste mesmo grupo (Figura 9).

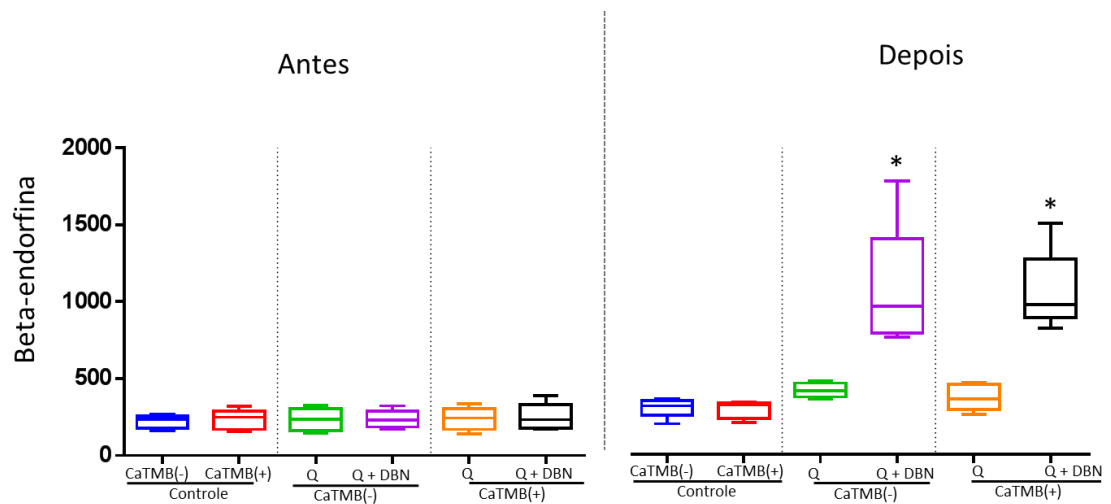


**Figura 9. Razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de cadelas com carcinoma em tumor misto benigno.** Análises divididas em antes e após o tratamento estabelecido e subcategorizados de acordo com a ausência (-) ou na presença (+) de metástase para linfonodo.

#### 6.4 Peptídeos opioides endógenos

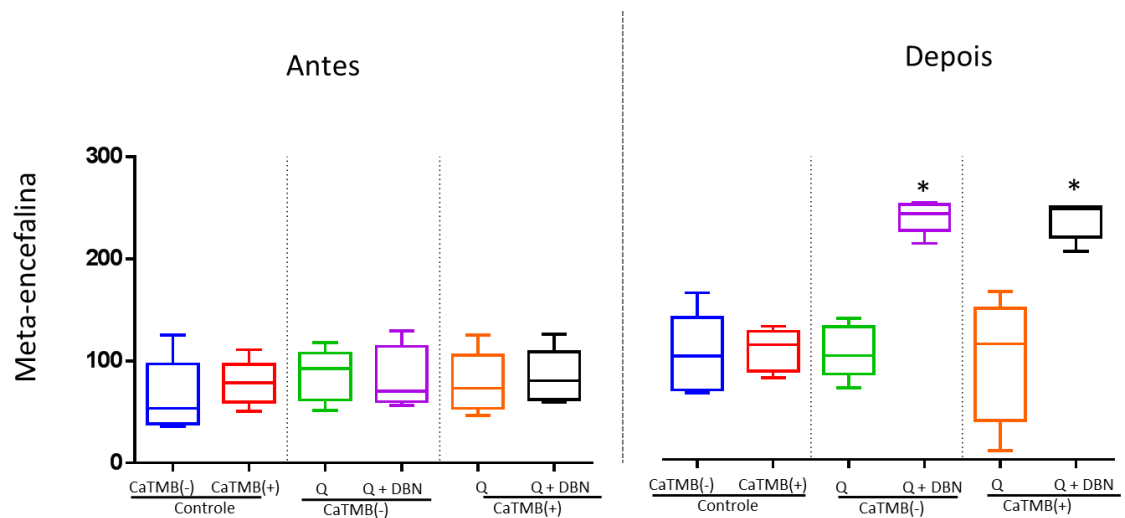
Nas concentrações séricas de beta-endorfina não houve diferenças significativas entre os grupos no período inicial. No entanto, na avaliação final (após a última sessão de quimioterapia pós-mastectomia) observou-se concentrações de beta-endorfina significativamente maior nos grupos CaTMB(-) Q+NDB e CaTMB(+) Q+NDB ( $p < 0,05$ ), em comparação aos grupos tratados apenas com quimioterapia CaTMB(-) Q e CaTMB(+) Q (Figura 10).





**Figura 10. Concentrações de beta-endorfina no sangue de cadelas com carcinoma em tumor misto benigno.** Análise de beta-endorfina circulante divididos em antes e após o tratamento estabelecido, mais subcategorizados de acordo com a ausência (-) ou na presença (+) de metástase para linfonodo. As concentrações de beta-endorfina para cada amostra foram realizadas por ELISA, sendo calculada em pg/ml. Diferenças significativas quando  $p < 0,05$ , destacadas por \*.

Assim como na beta-endorfina, nas análises séricas da meta-encefalina não houve diferenças significativas entre os grupos no período inicial. Contudo, no período final, quando comparado com os grupos que foram tratados apenas com quimioterapia (CaTMB(-) Q e CaTMB(+ ) Q), foram observadas concentrações significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) deste peptídeo opioide endógeno nos grupos que utilizaram NDB como tratamento adjuvante à quimioterapia (CaTMB(-) Q+NDB e CaTMB(+ ) Q+NDB (Figura 11).



**Figura 11. Concentrações de meta-encefalina no sangue de cadelas com carcinoma em tumor misto benigno.** Análise de meta-encefalina circulante divididos em antes e após o tratamento estabelecido, mais subcategorizados de acordo com a ausência (-) ou na presença (+) de metástase para linfonodo. As concentrações de meta-encefalina para cada amostra foram realizadas por ELISA, sendo calculada em ng/ml, Diferenças significativas quando  $p < 0,05$ , destacadas por \*.

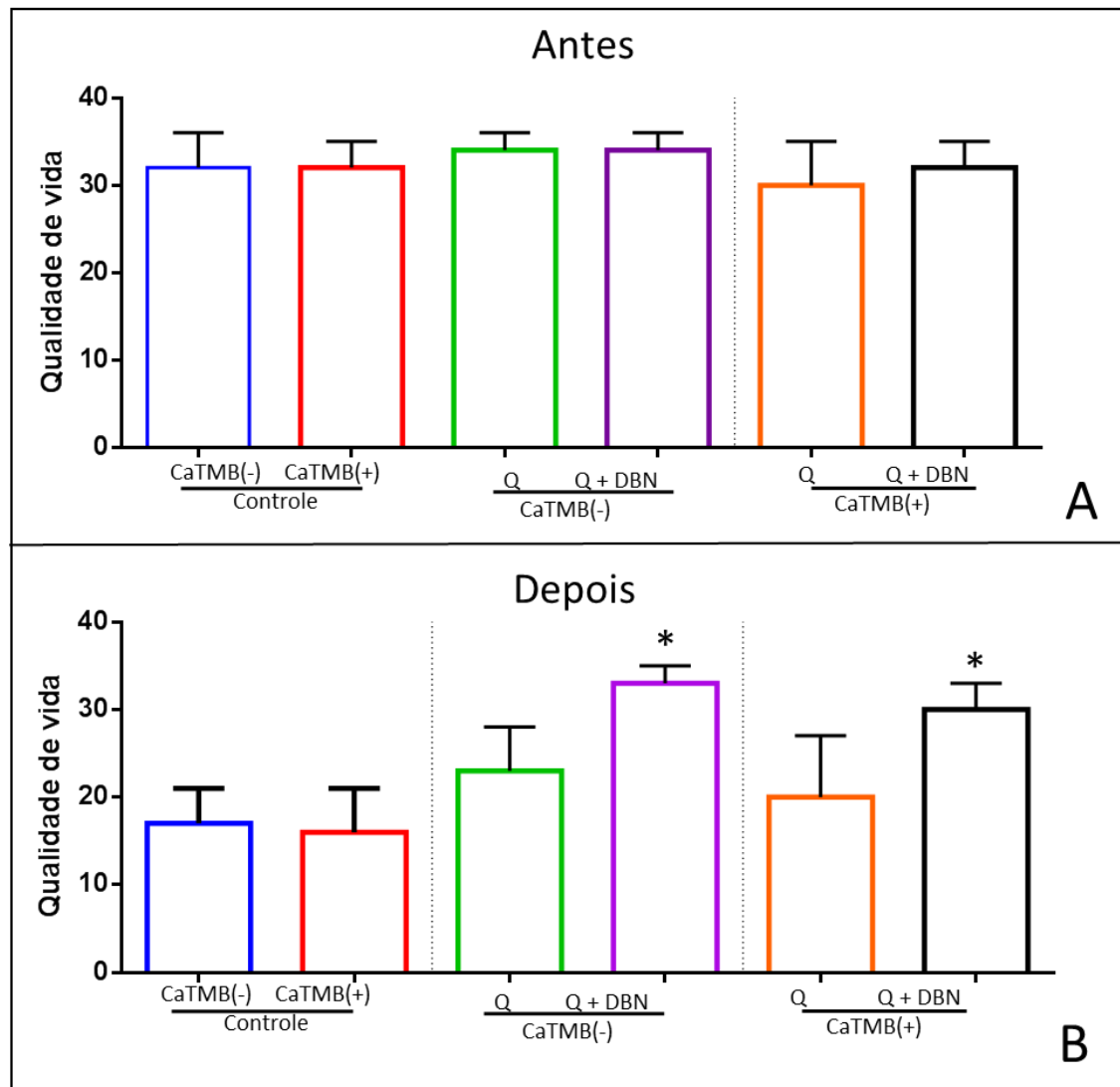
## 6.5 Qualidade de vida

Na avaliação da qualidade de vida as cadelas com CaTMB submetidas à quimioterapia, apresentaram escore de qualidade de vida inicial, antes do tratamento quimioterápico, variando entre 31 a 36 pontos. No final do tratamento quimioterápico as cadelas não tratadas com NDB apresentaram qualidade de vida final entre 20 e 23 pontos, enquanto que as cadelas tratadas com NDB mantiveram o escore de qualidade de vida avaliado no início do tratamento. Já as cadelas do grupo controle evidenciaram escore de qualidade de vida inicial semelhante ao grupo tratado com quimioterapia, diferindo apenas no escore de qualidade de vida final, que variou entre 11 e 21 pontos.

Após a quimioterapia, realizada em 20 animais, 14 proprietários (70%) julgaram que a qualidade de vida melhorou após o início do tratamento, quatro acharam que não houve diferença (20%) e duas (10%) declararam piora da qualidade de vida de seus animais. Ao serem questionados quanto à resposta ao tratamento quimioterápico associado ao NDB, dentre os 10 animais em que foi realizado este

tratamento, oito acharam que seu cão respondeu bem ao tratamento (80%), nenhum relatou resposta insatisfatória e duas não souberam responder a pergunta (20%).

A avaliação dos dados sobre qualidade de vida revelou que no início da quimioterapia todos os subgrupos mantiveram escore de qualidade de vida semelhantes (Figura 11 A). No entanto, ao final do tratamento quimioterápico, os grupos tratados com NDB, independente da presença ou não de metástase, mantiveram o seu escore inicial de qualidade de vida, enquanto nos grupos submetidos apenas a quimioterapia foi observada redução significativa da qualidade de vida (Figura 11 B). Desta forma, comparando os grupos isoladamente com relação ao momento inicial e final foram observadas diferenças significativas apenas nos grupos submetidos a quimioterapia como tratamento único (CaTMB(-) Q e CaTMB(+) Q). A comparação considerando apenas o momento pós-tratamento, revela mais uma vez, diferença significativa, devido a acentuada redução no escore de qualidade de vida, nos grupos (CaTMB(-) Q e CaTMB(+) Q (Tabela 7).



**Figura 12.** Representação do escore da qualidade de vida inicial e final das cadelas com CaTMB tratadas com carboplatina, submetidas ou não ao tratamento com NDB. Diferenças significativas ocorre quando  $p < 0,05$ , sendo destacadas por \*.

**Tabela 7.** Comparação da qualidade de vida entre grupos e momentos

	<b>Antes</b>	<b>Depois</b>	<b>p-valor (Wilcoxon)</b>
CaTMB(-) Q	34,0 ( $\pm 2,5$ ) Aa	23,0 ( $\pm 5,75$ ) Ba	0,0325*
CaTMB(-) Q+NDB	34,0 ( $\pm 2,5$ ) Aa	33,0 ( $\pm 2,25$ ) Ab	0,1250
p-value (Mann Whitney)	> 0,9999	0,0079*	
CaTMB(+) Q	30,0 ( $\pm 3,25$ ) Aa	20,0 ( $\pm 5,75$ ) Ba	0,0345*
CaTMB(+) Q+NDB	32,0 ( $\pm 2,25$ ) Aa	30,0 ( $\pm 3,00$ ) Ab	0,1350
p-value (Mann Whitney)	0,7381	0,0159*	

Letras maiúsculas diferente  $p < 0,05$  comparação no mesmo grupo antes e depois (linha) teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon

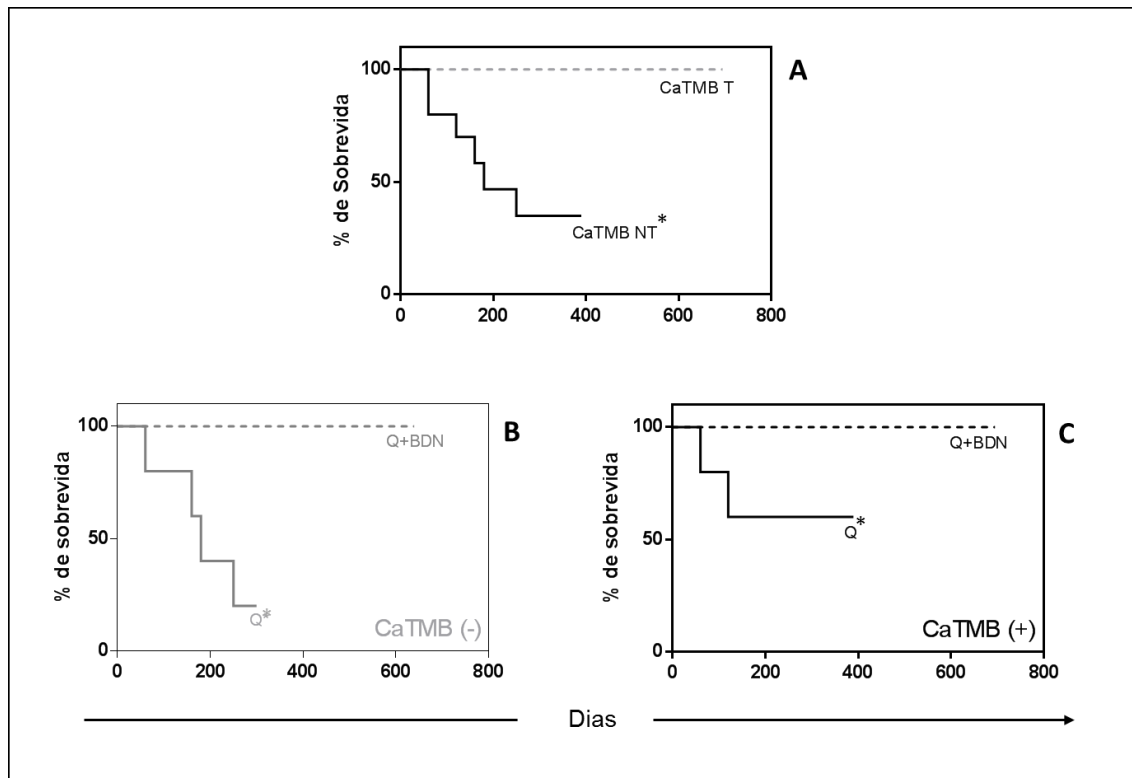
Letras minúsculas diferentes  $p < 0,05$  comparação entre grupos em cada momento (coluna) teste estatístico não paramétrico de Mann Whitney

Diferenças significativas quando  $p < 0,05$ , destacadas por \*.

## 6.6 Comparação das curvas de sobrevida

O tempo mínimo de sobrevida foi de 60 dias atribuído ao animal do grupo controle, que evoluiu para óbito por metástase pulmonar após a mastectomia e o máximo de 695 dias, após mastectomia e quimioterapia com NDB, atribuído ao animal do grupo CaTMB(+) Q+NDB.

Com base na curva de sobrevida estratificada pelos grupos avaliados, podem-se constatar valores significativos ( $p < 0,05$ ) nos grupos tratados com NDB em relação aos grupos não tratados com NDB, independente da presença ou ausência de metástase (Figura 13). As médias de sobrevida foram de 525,5; 200,2 e 123,1 dias nos grupos tratados com quimioterapia e NDB, quimioterapia pós-cirurgia e apenas mastectomia, respectivamente.



**Figura 13. Taxas de sobrevivência dos animais com CaTMB.** Curvas de sobrevivência dos grupos de acordo com a realização (T) ou não (NT) do tratamento com NDB (A) subgrupos categorizados de acordo com a ausência (-) ou presença (+) de metástase em linfonodo (B e C). Diferenças significativas quando  $p < 0,05$ , sendo destacadas por \*.

### Análise univariada e multivariada

Quando correlacionados parâmetros clínico-patológicos foi observado, tanto na análise univariada quanto na multivariada, que a utilização de NDB possui associação significativa com a condição de vida, quimioterapia, sobrevivência e qualidade de vida (Tabela 8).

**Tabela 8.** Análise univariada e multivariada dos parâmetros clínicos-patológicos associados com a utilização da NDB

<b>Parâmetros</b>	<b>Univariada</b>	<b>Multivariada</b>
<b>Condição (vivo)</b>	0,030*	0,017*
<b>CD4<sup>+</sup></b>	0,582	0,630
<b>CD8<sup>+</sup></b>	0,503	0,591
<b>Linfócito T</b>	0,787	0,410
<b>Razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup></b>	0,726	0,657
<b>Estadiamento</b>	0,207	0,147
<b>Graduação</b>	> 0,999	0,935
<b>Tamanho</b>	> 0,999	0,725
<b>Quimioterapia</b>	0,004*	0,003*
<b>Sobrevida</b>	< 0,0001*	< 0,0001*
<b>Qualidade vida</b>	< 0,0001*	< 0,0001*

## 7. DISCUSSÃO

Os carcinomas em tumores mistos benignos de mama são as neoplasias mais frequentes das fêmeas caninas, sendo crescente o número de estudos direcionado ao seu comportamento biológico e tratamento, em virtude da sua alta casuística e variável potencial de malignidade.

Foi observada maior frequência de animais diagnosticados com CaTMB na faixa etária de 10 a 14 anos. Este resultado corrobora os achados descritos na literatura que indicam uma maior frequência de tumores mamários em cadelas entre nove e 13 anos, com rara ocorrência da doença em cães com idade inferior a dois anos (BENJAMIN et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2003; PIRES et al., 2003; FURIAN et al., 2007; RODASKI; PIEKARZ, 2009). Contudo, na Medicina Veterinária, ainda não há estudos que apontem diferenças consistentes no prognóstico de animais, em função da idade (PHILIBERT et al., 2003).

De acordo com Misdorp (2002), o Poodle é considerada uma das raças que apresenta predisposição genética para o desenvolvimento de neoplasias mamárias. Entretanto, Peleteiro (1994) acredita que embora os tumores de mama sejam mais frequentemente diagnosticados em algumas raças, ainda não existem subsídios que embasem a predisposição racial para o desenvolvimento desta doença. No presente estudo, a exemplo do que foi relatado por Estrela-Lima em 2010, foi observada uma maior frequência de cadelas da raça Poodle. Contudo, este fato pode estar associado ao maior número de animais desta raça ou a existência de várias linhagens e cruzamentos (HATAKA, 2004).

Resultados interessantes e, de certa forma, um pouco controversos foram observados com relação a alimentação e condição corporal das pacientes, pois apesar da grande maioria dos animais (70%) ter a inserção marcante de comida caseira na dieta, foi predominante a condição corporal dentro da normalidade (70%). Este alto percentual reforça os dados observados por alguns autores, que relatam a existência de correlação positiva entre a alimentação caseira e o desenvolvimento tumoral em



cadelas (PELETEIRO, 1994; PEREZ-ALENZA et al., 1997; SORENMO et al., 2000; SIRIVAIDYAPONG, 2003), a partir da ingestão de alguns ácidos graxos (GARCÍA-SOLÍS e ACEVES, 2005) e exposição do animal a carcinógenos químicos, iniciadores presentes na dieta (GREENWALD et al., 2001). Já a condição corporal dentro dos parâmetros de normalidade, inicialmente sugere pouca influência desta variável no desenvolvimento neoplásico. Contudo, cabe ressaltar que a maioria das cadelas obesas (4/6) eram portadoras de tumores maiores que cinco centímetros e com metástase regional, ou seja, em estágio avançado. Desta forma, talvez a condição corporal seja importante fator para a progressão neoplásica e não para sua iniciação. Estudos relatam que mulheres obesas apresentam elevadas concentrações de estrógeno proveniente da transformação no tecido adiposo da androstenediona em estrona e posteriormente em estrógeno, hormônio sabidamente envolvido na carcinogênese mamária (STEWART; HEPPNER, 1997).

Com relação ao histórico reprodutivo dos animais pesquisados, o percentual de cadelas cujos proprietários relataram utilização de progestágenos foi de 30% (9/30). Tais achados reforçam o papel dos hormônios sexuais na iniciação e/ou promoção da carcinogênese mamária. A utilização da progesterona exógena em cães e gatos estimula a síntese de hormônio do crescimento na glândula mamária com proliferação lóbulo-alveolar e consequente hiperplasia de elementos mioepiteliais e secretórios, induzindo a formação de nódulos benignos em animais jovens (MISDORP et al., 2002; SILVA et al., 2004). Esta participação dos progestágenos se torna ainda mais importante neste estudo, pois o CaTMB se origina da transformação maligna do componente epitelial do tumor misto benigno.

Os valores médios de hemácias, plaquetas e leucócitos observados nas cadelas dos dois subgrupos não tratados com NDB foram inferiores quando comparado com o grupo tratado com esta droga. O principal efeito colateral da carboplatina é hematológico, que se manifesta principalmente por leucopenia, podendo também ocorrer anemia e trombocitopenia (LANA et al., 2007). Calpa et al. (2010) utilizando a cisplatina como quimioterápico relatou valores médios de leucócitos de  $9,4 \times 10^3 /\mu\text{l}$  sem redução do número de leucócitos ao longo do tratamento, entretanto o período

máximo de observação foi de 84 dias. Desta forma, a redução dos leucócitos observada no presente estudo pode ser atribuída ao maior período de quimioterapia.

Dentre os efeitos colaterais que podem ser observados com a utilização da carboplatina estão às alterações renais, sendo necessária avaliação da função renal antes e durante o tratamento, além de efeitos gastrointestinais como anorexia, êmese, constipação e alterações hepáticas (RODASKI; DE NARDI, 2008). A função renal das cadelas deste estudo não foi afetada pela quimioterapia com carboplatina, pois as concentrações séricas de creatinina e uréia mantiveram-se dentro dos parâmetros fisiológicos para a espécie nos grupos tratados com quimioterapia. Este resultado era esperado uma vez que, apesar da excreção da renal da carboplatina, este é um fármaco seguro que pode ser utilizado com critério em pacientes nefropatas. Na avaliação do fígado, considerando os parâmetros relacionados a integridade morfológica dos hepatócitos (ALT) das cadelas deste estudo verificou-se que não ocorreu hepatotoxicidade. O que também era esperado uma vez que o quimioterápico empregado no estudo não causa toxicidade hepática (STOCKHAUS et al., 1999). Ausência de alterações na bioquímica sérica (creatinina, uréia e ALT) em cadelas com tumor mamário tratadas com doxorubicina e ciclofosfamida também foram relatadas por Daleck et al. (1998).

A análise dos dados observados quanto à macroscopia dos tumores indicam a predominância de tumores multicêntricos, com comprometimento bilateral da cadeia mamária, sendo as mamas abdominais e inguinais mais frequentemente acometidas por tumores maiores que cinco centímetros. Estes resultados corroboram os obtidos por Burini (2002), que relata que 57% dos tumores são multicêntricos. Fonseca e Daleck (2000), Burini (2002) e Lana e colaboradores (2007) afirmam que a frequência de neoplasia mamária é significativamente maior nas mamas inguinais e abdominais sem, contudo, explicar o motivo de tal predileção. Para Moulton (1990), estas mamas são mais acometidas, devido à maior quantidade de parênquima mamário, sofrendo assim maior alteração proliferativa em resposta aos hormônios.

A predominância de tumores grandes, importante fator prognóstico relacionado à sobrevida, observada nas pacientes atendidas no Hospital Veterinário da

UFBA sugere uma demora na procura pelo atendimento médico veterinário, sendo tal fato explicado pelo baixo poder aquisitivo dos guardiães correlacionados com fatores socioeconômicos e culturais (KARAYANNOPOULOU et al., 1990; OLIVEIRA et al., 2003; TORIBIO, 2008).

Dentre as modalidades de tratamento da neoplasia mamária está a quimioterapia antineoplásica, que pode ser utilizada como terapia neoadjuvante ou adjuvante à cirurgia (RODASKI; PIEKARZ, 2009). Neste estudo a maioria das cadelas concluíram o tratamento quimioterápico, no entanto 40% das cadelas apresentaram vômitos logo após cada sessão de quimioterapia e 10% apresentaram diarreia. Estes efeitos colaterais, após utilização da carboplatina, já são esperados e descritos na literatura (GOTTESMAN, 2002). Cabe ressaltar que a grande maioria dos animais que apresentaram efeitos colaterais (90%) não recebeu tratamento auxiliar com naltrexona (NDB).

A naltrexona é uma droga que possibilita o tratamento por via oral, além de possuir baixo custo e forma acessível de aquisição, o que facilitou a sua utilização para execução deste trabalho. Sabe-se que em seres humanos tratados com quimioterapia, a naltrexona em baixas doses promove diminuição dos efeitos colaterais causados pelos quimioterápicos, por meio da melhoria do sistema imune (BROWN; PANKSEPP, 2009; DONAHUE et al., 2011). Segundo Metze et al. (1999) os efeitos colaterais provenientes da utilização da própria NDB observado no homem incluíram letargia, tonturas, vômitos e diarreia, sendo, contudo, pouco frequentes e limitados ao início do tratamento. No presente estudo, as cadelas que utilizaram a naltrexona como tratamento adjuvante não apresentaram os efeitos colaterais descritos acima.

As manifestações observadas nestes animais foram disposição para brincadeiras, apetite e sociabilidade. Tais dados estão de acordo com o estudo realizado por Brown e Panksepp (2009), que associou a utilização da NDB com qualidade de vida e bem estar no homem. Aparentemente, por apresentar redução dos efeitos colaterais da quimioterapia e contribuir para a manutenção da qualidade de vida, a NDB pode se tornar uma importante ferramenta no tratamento adjuvante de tumores de mama em cadelas.

A avaliação do percentual de linfócito T CD8<sup>+</sup>, bem como as concentrações séricas de beta-endorfina e meta-encefalina, foram significativamente maiores nos grupos tratados com NDB em comparação com os grupos não tratados e o grupo controle. Contudo, este aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> ficou restrito ao grupo sem metástase. Desta forma, acredita-se que a terapia com NDB proporciona um estímulo à resposta imune celular, via linfócito T CD8<sup>+</sup>, e a condição “não ter metástase” favorece este benefício.

Nos animais tratados com NDB foi observada correlação direta entre a concentração de beta-endorfina e meta-encefalina e a maior efetividade da resposta imune celular, via linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Naltrexona em doses baixas induzem maior efetividade dos linfócitos, pois estas células de defesa expressam receptores para peptídeos opioides endógenos (HAZUM et al., 1979).

Quando utilizada em doses baixas, a naltrexona se liga reversivelmente aos receptores opioides endógenos por curto período de tempo. Após 3 a 4 horas, a naltrexona se desliga destes receptores, aumentando a concentração de beta-endorfina e meta-encefalina. Os linfócitos expressam receptores para peptídeos opioides endógenos e a ativação destes receptores resulta em um maior contato de células efetoras com as células tumorais (MELO; CARVALHO, 2009). Por meio deste contato, ocorre liberação de ATP, que ao reagir com a enzima adenilato ciclase, libera AMPc nos linfócitos (SOJKA et al., 2008). Por sua vez, o AMPc promove a inibição da proliferação neoplásica e nos linfócitos gera a ativação seletiva de citocinas (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) (TANG; BLUESTONE, 2008). O IFN- $\gamma$  estimula os macrófagos a secretarem interleucina-2 (IL-2) que, por sua vez, estimula os linfócitos T a aumentar a produção de IFN- $\gamma$  (HAZUM et al., 1979). O macrófago ativado produz TNF- $\alpha$ , que promove apoptose das células malignas (morte celular) (STEIN et al., 2003).

Nesta pesquisa verificou-se que as concentrações séricas de beta-endorfina e meta-encefalina foram significativamente maiores nos grupos tratados com NDB, com comparação com os grupos não tratados com NDB, assim como o grupo controle. Nestes grupos foi observada manutenção da qualidade de vida e maior sobrevivência do que os grupos controle (CaTMB(-) e CaTMB(+)) e não tratados com NDB (CaTMB(-)

Q e CaTMB(+) Q). Tais dados reforçam que os peptídeos opioides endógenos envolvidos no metabolismo da naltrexona atuam no bem estar, possibilitando manutenção e até mesmo melhoria na qualidade de vida e sobrevida dos pacientes, assim como fator estimulante aos efeitos benéficos no sistema imune (BROWN; PANKSEPP, 2009).

O escore de qualidade de vida demonstra o bem estar dos animais durante o período da quimioterapia, segundo uma avaliação do proprietário (YAZBEK; FANTONI, 2005). No final do tratamento quimioterápico as cadelas não tratadas com NDB apresentaram redução na qualidade de vida final, enquanto as cadelas tratadas com NDB mantiveram o escore de qualidade de vida avaliado no início do tratamento.

Os resultados desta pesquisa demonstraram que a qualidade de vida está diretamente relacionada aos efeitos benéficos da NDB e que estes apresentaram significativa importância na evolução do tratamento e na sobrevida. Tais dados estão em concordância com os verificados por Berkson et al. (2006) e Donahue e colaboradores (2011), em que utilizaram a naltrexona em humanos com tumores de pâncreas e ovários, respectivamente. Nestes trabalhos, com o emprego da naltrexona como tratamento adjuvante destas neoplasias, foi possível obter melhoria na qualidade de vida dos pacientes.

Com base nos resultados apresentados, sugere-se que a investigação da qualidade de vida em cadelas com neoplasia mamária seja incorporada à prática clínica, pois seu conhecimento auxilia os veterinários no processo de decisão de tratamento e instituição de medidas preventivas, para promover o aumento da sobrevida global.

A comparação das curvas de sobrevida estratificada demonstrou valores significativos nos grupos tratados com NDB em relação aos grupos não tratados com NDB, independente da presença ou ausência de metástase. Tais resultados obtidos nestas análises estão de acordo ao observado por Brown e Panksepp (2009), reforçando assim que a utilização da NDB está diretamente ligada ao aumento da sobrevida e qualidade de vida. Os diferentes mecanismos de ação da naltrexona, tanto os efeitos na própria célula tumoral como no sistema imunológico, promovem ao paciente bem estar

e redução dos efeitos colaterais da quimioterapia, auxiliando assim no aumento da sobrevida (ZAGON; MCLAUGHLIN, 2005).

Nesta pesquisa, as cadelas que evoluíram ao óbito pela doença foram necropsiadas, sendo observado uma frequência maior de metástase a distância para pulmão e pele. A disseminação da neoplasia mamária pode ocorrer tanto pela via linfática quanto hematogêna, sendo os órgãos mais frequentemente afetados os pulmões, rins, fígado, baço, pele, encéfalo e os ossos (RODASKI; PIEKARZ; 2009; RIBEIRO et al., 2013).

## 8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo, nas condições metodológicas empregadas, permitiram concluir:

- A naltrexona em doses baixas foi utilizada pela primeira vez na medicina veterinária para tratamento adjuvante à quimioterapia em cadelas com diagnóstico histopatológico de carcinoma mamário, apresentando dose segura e efetiva para esta espécie;
- A naltrexona em baixas doses potencializou a resposta imune celular contra o tumor, via aumento das proporções de linfócitos T CD8<sup>+</sup>;
- A NDB, quando utilizada como terapêutica adjuvante à quimioterapia com carboplatina, promoveu redução dos efeitos colaterais provocados por estes, representando uma alternativa viável de tratamento combinado em cadelas com CaTMB;
- A NDB auxiliou na manutenção dos parâmetros hematológicos e perfil bioquímico sérico em cadelas com CaTMB tratadas com quimioterapia, independente da ausência ou presença de metástase regional;
- A naltrexona em baixas doses aumentou as concentrações séricas de beta-endorfina e meta-enkefalina, auxiliando no bem estar e proporcionando manutenção da qualidade de vida em cadelas com CaTMB;
- A NDB contribuiu para o aumento na taxa de sobrevivência em cadelas submetidas à quimioterapia, tornando-se importante ferramenta no tratamento de tumores de mama em cadelas.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, Y. P. Low dose naltrexone therapy for multiple sclerosis. **Medical Hypnosis**, v. 64, p. 721-774, 2004.

ALEXANDER, K.; JOLY, H.; BLOND, L.; D'ANJOU, M. A.; NADEAU, M. È.; OLIVE, J.; BEAUCHAMP, G. A. Comparison of computed tomography, computed radiography, and film-screen radiography for the detection of canine pulmonary nodules. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 3, n. 53, p. 258-265, 2012.

AMAR, A.; RAPOPORT, A.; FRANZI, S. A.; BISORDI, C.; LEHN, C. N. Qualidade de vida e prognóstico nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 68, n. 3, p. 400-403, 2002.

ANDRADE, F. H. E.; FIGEUIROA, F. C.; BERSANO, P. R. O.; BISSACOT, D. Z.; ROCHA, N. S. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminats. **Diagnostic Pathology**, v. 45, p. 1-5, 2010.

ARTWOHL, M.; RODEN, M.; HÖLZENBEIN, T.; FREUDENTHALER, A.; WALDHÄUSL, W.; BAUMGARTNER-PARZER, S. M. Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 26, n. 4, p. 577-580, 2002.

BALDIN, J. C.; FISCHER, I. C. C.; MORAES, J.; GIOPATO, G.; RAMALHO, M. F. P. D.; CONTIERI, M. B. Importância do estudo das neoplasias em medicina veterinário: Conceitos atuais. In: **Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente**, v. 3, n. 9, p. 9-13, 2005.

BENJAMIN, S. A.; LEE, A. C.; SAUNDERS, W. J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in Beagles. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 423-436, 1999.

BERKSON, B. M.; RUBIN, D. M.; BERKSON, A. J. The long-term survival of a patient with pancreatic cancer with metastases to the liver after treatment with the intravenous alpha-lipoic acid/low-dose naltrexone protocol. **Integrative Cancer Therapies**, v. 5, n. 1, p. 83-89, 2006.

BERTAGNOLLI, A. C.; CASSALI, G. D.; GENELHU, M. C.; COSTA, F. A.; OLIVEIRA, J. F.; GONÇALVES, P. B. Immunohistochemical Expression of p63 and Np63 in Mixed Tumors of Canine Mammary Glands and Its Relation with p53 Expression. **Veterinary Pathology**, v. 46, n.3, p. 407-415, 2009.



BERTAGNOLLI, A. C.; FERREIRA, E.; DIAS, E. J.; CASSALI, G. D. Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 8, 2011.

BHARGAVA, R.; GERALD, W. L.; LI, A. R.; PAN, Q.; LAL, P.; LADANYI, M.; CHEN, B. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. **Modern Pathology**, v. 18, p.1027-1033, 2005.

BIHARI, B.; DRURY, F. M.; RAGONE, V. P.; OTTOMANELLI, G. A.; BUIMOVICI-KLEIN, E.; ORBE, M. G. Low dose naltrexone in the treatment of Acquired Immune Deficiency Syndrome. In: **Poster presentation at the IV international AIDS conference**, Stockholm, Sweden; 1988.

BOCARDI, M.; DABUS, D. M. M.; TENTRIN, T. C.; LIMA, G. S.; BARIANI, M. H. Influência hormonal na carcinogênese mamária em cadelas. **Revista científica eletrônica de Medicina veterinária**, ano VI, n. 11, 2008.

BODE-LESNIEWSKA, B.; DOURS-ZIMMERMANN, M. T.; ODERMATT, B. F.; BRINER, J.; HEITZ, P. U.; ZIMMERMANN, D. R. Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, p. 303-312, 1996.

BROWN, D. C.; BOSTON, R. C.; COYNE, J. C.; FARRAR, J. T. Development and psychometric testing of an instrument designed to measure chronic pain in dogs with osteoarthritis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 631-637, 2007.

BROWN, N.; PANKSEPP, J. Low-dose naltrexone for disease prevention and quality of life. **Medical Hypotheses**, v. 72, n. 3, p. 333-337, 2009.

BURINI, C. H. P. **Caracterização clínica, citopatológica e bioquímica do câncer mamário de cadelas sem raça definida**. Botucatu – SP, Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2002. 164p. Dissertação de Mestrado - Área de Clínica Veterinária.

CABALLERO-HERNÁNDEZ, D.; WEBER, R. J.; HICKS, M. E.; TAMEZ-GUERRA, R.; RODRIGUEZ-PADILLA, C.; TAMEZ-GUERRA, P.; RICE, K.C.; ANANTHAN, S.; GOMEZ-FLORES, R. Potentiation of rat lymphocyte proliferation by novel non-peptidic synthetic opioids. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 1271-1278, 2005.

CALPA, C. O.; DALECK, C.; CASTRO, J. T. Evaluación del hemograma en caninos sanos sometidos a la administración de cisplatina. **Rev MVZ Córdoba**, v. 15, n. 2, p. 2102-2110, 2010.

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

CASSALI, G. D.; MELO, B. M.; MADUREIRA, N.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; RIBEIRO, G. M.; CAMPOS, C. B. Mammary gland diagnosis of the Laboratory of Comparative Pathology - UFMG, from 2000 to 2008. In: **34 World Small Animal Veterinary Association Congress**, 2009, São Paulo. **Clínica Veterinária (Suplemento)**, v. 14, p. 173-173, 2009.

CASTELLANO, M. C.; IDIART, J. R. Carcinoma mamario inflamatorio en la perra. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 76, n. 4, p. 244-248, 1994.

CAVALCANTI, M. F.; CASSALI, G. D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. **Revista Clínica Veterinária**, ano XI, n. 61, p. 56-63, 2006.

CLEARY, M. P.; GROSSMANN, M. E.; RAY, A. Effect of obesity on breast cancer development. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 2, p. 202-213, 2010.

CRIAR, B. A.; KORNIEYEVA, E.; GOODIN, D. S. Estudo piloto de naltrexona em dose baixa e qualidade de vida na esclerose múltipla. **Annals of Neurology**, v. 68, n. 2, p. 145-50, 2010.

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

DAMASCENO, K. A.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; RIBEIRO, L. G. R.; RABELO, B. S.; CAMPOS, C. B.; BARROS, A. L. B.; CASSALI, G. D. Versican expression in canine carcinomas in benign mixed tumours: is there an association with clinical pathological factors, invasion and overall survival? **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 195, 2012.

DIEUDONNE, M. N.; BUSSIÈRE, M.; SANTOS, E.; LENEVEU, M. C.; GIUDICELLI, Y.; PECQUERY, R. Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, n. 1, p. 271-279, 2006.

DOBSON, J. M. Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. **ISRN Veterinary Science**, p. 175-180, 2013.

DOBSON, J. M.; SAMUEL, S.; MILSTEIN, H.; ROGERS, K.; WOOD, J. L. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 43, p. 240-246, 2002.

DONAHUE, R. N.; MCLAUGHLIN, P. J.; ZAGON, I. S. Low-dose naltrexone suppresses ovarian cancer and exhibits enhanced inhibition in combination with cisplatin. **Experimental Biology and Medicine**, v. 236, p. 883-895, 2011.

DUTRA, A. P.; GRANJA, N. V.; SCHMITT, F. C.; CASSALI, G. D. C-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1673-1681, 2004.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Method for grading breast cancer. **Journal Clinical Pathology**, v. 46, p. 189-190, 1993.

ERDÉLYI, I.; NIESKENS, D. H. M.; DIJK, J. E.; VASS, L.; NEDERBRAGT, H. Immunohistochemical evaluation of versican, in relation to chondroitin sulphate, in canine mammary tumors. **Journal of Histology & Histopathology**, v. 18, p. 1067-1080, 2003.

ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M. S.; COSTA-NETO, J. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BARROUIN-MELO, S. M.; CARDOSO, S. V.; MARTINS-FILHO, O. A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. **BMC Cancer**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2010.

ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M. S.; COSTA-NETO, J. M.; RIBEIRO, L. G.; DAMASCENO, K. A.; D'ASSIS, M. J.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 131, n. 3, p. 751-763, 2012.

FAVROT, C.; LINEK, M.; MUELLER, R.; ZINI, E. Development of a questionnaire to assess the impact of atopic dermatitis on health-related quality of life of affected dogs and their owners. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 63-69, 2010.

FELICIANO, M. A. R.; JOÃO, C. F.; CARDILLI, D. J.; CRIVELARO, R. M.; VICENTE, W. R. R. Neoplasia mamária em cadelas – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária**, ano IX, n. 1, 2012.

FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; CAVALCANTI, M. F.; SCHMITT, F. C.; CASSALI, G. D. The relationship between tumor size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, p. 230-235, 2009.

FONSECA, C. S.; DALECK, C. R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, v. 30, p. 731-735, 2000.

FUJITA, Y.; MURAKAMI, M.; OGAWA, Y.; MASUZAKI, H.; TANAKA, M.; OZAKI, S.; NAKAO, K.; MIMORI, T. Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. **Clinical e Experimental Immunology**, v. 128, n. 1, p. 21-26, 2002.

FURIAN M.; SANDEI, C. F. C. S.; ROCHA, E. J. N.; LOT, R. F. E. Estudos retrospectivo dos tumores mamários em caninos e felinos atendidos no Hospital Veterinário da FAMED entre 2003 a 2007. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, SP, n. 8, 2007.

GARCÍA-SOLIS, P.; ACEVES, C. Estudio de factores nutricionales asociados a la prevención de cáncer mamario. Importancia de los modelos animales. **ALAN – Archivos Latinoamericanos de nutrición**, v. 55, n. 3, 2005.

GENELHU, M. C. L. S.; CARDOSO, S. V.; GOBBI, H.; CASSALI, G. D. A comparative study between mixed-type tumours from human salivary and canine mammary glands. **BMC Cancer**, v. 7, p. 218, 2007.

GERALDES, M.; GÄRTNER, F.; SCHMITT, F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumors. **The Veterinary Record**, v. 146, p. 403-436, 2000.

GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. **The Annual Review of Medicine**, n. 53, p. 615-627, 2002.

GREENWALD, P.; CLIFFORD, C. K.; MILNER, J. A. Diet and cancer prevention. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 948-965, 2001.

HATAKA, A. **Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia: valor e significado para diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas.**

Botucatu – SP Universidade Estadual Paulista, Faculdade de medicina Veterinária e zootecnia, 2004. 90p. Tese de Doutorado - Área de clínica Veterinária.

HAZUM, E.; CHANG, K. J.; CUATRECASAS, P. Specific nonopioid receptors for beta-endorphin. **Science**, v. 205, n. 4410, p. 1033-1035, 1979.

HEDLUND, C. S. Cirurgia dos Sistemas Reprodutivo e Genital. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos animais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.729-734, 2008.

HELLMÉN, E.; BERGSTRÖM, R.; HOLMBERG, L.; SPÅNGBERG, I. B.; HANSSON, K.; LINDGREN, A. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. **Veterinary Pathology**, n. 30, p. 20-27, 1993.

HENDERSON, B. E.; FEIGELSON, H. S. Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 427-433, 2000.

HENRY, C. J. Prognostic factors for veterinary oncology. In: World Small Animal Veterinary Association, 2007, **Proceedings...**, Sydney, Australia.

HOLLT, V. Opioid peptide processing and receptor selectivity. **The Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 26, p. 59-77, 1986.

HORTA, R. S.; COSTA, M. P.; LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B.; CASSALI, G. D. Fatores prognósticos e preditivos dos tumores caninos definidos com o auxílio da imuno-histoquímica. **Ciência Rural**, v. 42, n. 6, p. 1033-1039, 2012.

HOU, W. K.; XU, Y. X.; YU, T.; ZHANG, L.; ZHANG, W. W.; FU, C. L.; SUN, Y.; WU, Q.; CHEN, L. Adipocytokines and breast cancer risk. **Chinese Medical Journal**, v. 12, n. 18, p. 1592-1596, 2007.

JONES, T. C; HUNT, R. D; KING, N. W. Distúrbios do crescimento: aplasia até neoplasia. In: \_\_\_\_\_. **Patologia Veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, p. 95-103, 2000.

JORDAN, V. C. Tamoxifen (ICI46, 474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 269-276, 2006.

KARAYANNOPOULOU, M.; LAKDRIMIDOU, E.; DESSIRIS, A. Some epidemiological aspects of canine mammary tumors treatment and prognosis. **European Journal of Companion Animal Practice**, v. 1, p. 41-47, 1990.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 4. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, p. 619-636, 2007.

LEE, C. H.; KIM, W.; LIM, J. H.; KANG, M. S.; KIM, D. Y.; KWEON, O. K. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Science**, n. 5, p. 63-69, 2004.

LEE, M. W.; FUJIOKA, K. Naltrexone for the treatment of obesity: review and update. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 11, n. 10, p. 1841-1845, 2009.

LEITE, C. A. V. G.; COSTA, J. V. G.; CALLADO, R. B.; TORRES, J. N. L.; LIMA JÚNIOR, R. C. P.; RIBEIRO, R. A. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 8, n. 29, p. 130-142, 2012.

LEONETTI, J. P.; MARZO, S. J.; PETRUZZELLI, G. J.; HERR, B. Recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 133, n. 3, p. 319-322, 2005.

LISSONI, P.; MALUGANI, F.; MALYSHEVA, O.; KOZLOV, V.; LAUDON, M.; CONTI, A. Neuroimmunotherapy of untreatable metastatic solid tumors with subcutaneous low-dose interleukin-2, melatonin and naltrexone, modulation of interleukin-2-induced antitumor immunity by blocking the opioid system. **Neuroendocrinology Letters**, v. 23, p. 341-344, 2002.

LUINI, A.; AGUILAR, M.; GATTI, G.; FASANI, R.; BOTTERI, E.; BRITO, J. A.; MAISONNEUVE, P.; VENTO, A. R.; VIALE, G. Metaplastic carcinoma of the breast, an unusual disease with worse prognosis: the experience of the European Institute of Oncology and review of the literature. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 101, p. 349-353, 2007.

LYNCH, S.; SAVARY-BATAILLE, K.; LEEUW, B.; ARGYLE, D. J. Development of a questionnaire assessing health-related quality-of-life in dogs and cats with cancer. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 9, p. 172-182, 2011.

MAGALHÃES, A. M.; RAMADINHA, R. R.; BARROS, C. S. L.; PEIXOTO, P. V. Estudo comparativo entre citopatologia e histopatologia no diagnóstico de neoplasias caninas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 23-32, 2001.

MANNELLI, P.; PATKAR, A. A.; PEINDL, K.; MURRAY, H. W.; WU, L. T.; HUBBARD, R. Effectiveness of low-dose naltrexone in the post-detoxification

treatment of opioid dependence. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 27, p. 468–474, 2007.

McMILLAN, F. D. Quality of life in animals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 216, p. 1904-1910, 2000.

MELLANBY, R. J.; HERRTAGE, M. E.; DOBSON, J. M. Owners assessments of their dog's quality of life during palliative chemotherapy for lymphoma. **Journal of Small Animal Practice**, v. 44, p. 100-103, 2003.

MELO, K. M.; CARVALHO, B. T. C. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas T regulatory cell: mechanism of action and function in human diseases. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 32, n. 5, 2009.

MERLO, D. F.; ROSSI, L.; PELLEGRINO, C.; CEPPI, M.; CARDELLINO, U.; CAPURRO, C.; RATTO, A.; SAMBUCCO, P. L.; SESTITO, V.; TANARA, G.; BOCCHINI, V. Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 22, p. 976-984, 2008.

METZE, D.; REIMANN, S.; BEISSERT, S.; LUGER, T. Efficacy and safety of naltrexone, an oral opiate receptor antagonist, in the treatment of pruritus in internal and dermatological diseases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 41, p. 533-539, 1999.

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

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

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T. P. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat, Vol VII, 2nd series. **Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington D.C., and World Health Organization Collaborating Center of Worldwide Reference on Comparative Oncology**, p. 22-23, 1999.

MOL, J. A.; GARDEREN, E. V.; RUTTEMAN, G. R.; RIJNBERK, A. New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary gland of dogs, cats and humans. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 57, p. 67-71, 1996.

MOORE, A. Advances in the treatment of mammary neoplasia. In: World Congress WSAVA/FECAVA/CSAVA, **Proceedings...**, p. 562-565, 2006.

MORETTO, A. J. G.; CORRÊA, F. G. Radioterapia para carcinomas em animais domésticos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 11, n. 20, 2013.

MORRIS, J. S.; DOBSON, J. M.; BOSTOCK, D. E.; O'FARRELL, E. Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms. **The Veterinary Record**, v. 142, p. 656-658, 1998.

MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: \_\_\_\_\_ **Tumors in domestic animals**. 3. ed. Los Angeles: University of California Press, p. 518-552, 1990.

MOULTON, J. E.; TAYLOR, N.; DORN, C. R.; ANDERSEN, A. C. Canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, n. 7, p. 289-320, 1970.

MOUSA, S. A.; SHAKIBAEI, M.; SITTE, N.; SCHAFER, M.; STEIN, C. Subcellular pathways of beta-endorphin synthesis, processing, and release from immunocytes in inflammatory pain. **Endocrinology**, v. 145, p. 1331-1341, 2004.

MUNSON, L.; MORESCO, A. Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals. **Breast Disease**, n. 28, p. 7-21, 2007.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Complexos de platina (II) na terapia do câncer. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, p. 196-209, 2011.

NIESSEN, S. J.; POWNEY, S.; GUITIAN, J.; NIESSEN, A. P.; PION, P. D.; SHAW, J. A.; CHURCH, D. B. Evaluation of a quality of life tool for dogs with diabetes mellitus. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, p. 953-961, 2012.

NOVOSAD, C. A. Principles of treatment for mammary gland tumors. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 8, n. 2, p. 107-109, 2003.

NUNES, V. A.; CHAUDON, M. B. O.; FERREIRA, M. L. G.; PLIEGO, C. M.; ABÍLIO, E. J.; CARVALHO, E. Q. Uso da imunoterapia com BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) na obtenção de margem cirúrgica contida nos tumores mamários em cães (*Canis familiaris*). **Revista de Ciências Vida**, v. 31 n. 1, p. 15-25, 2011.

O'CONNOR, P.G.; KOSTEN, T. R. Desintoxicação de opióides rápida e técnicas de ultra-rápidos. **JAMA**, v. 279, p. 229-34, 1998.



OLIVEIRA, L. O.; OLIVEIRA, R. T.; LORETTI, A. P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, São Paulo, v. 31, n. 2, p.105-110, 2003.

OTONI, C. C.; RAHAL, S. C.; VULCANO, L. C.; RIBEIRO, S. M.; HETTE, K.; GIORDANO, T.; DOICHE, D. P.; AMORIM, R. L. Survey radiography and computerized tomography imaging of the thorax in female dogs with mammary tumors. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 20, n. 52, 2010.

OWEN, L. M. TNM Classification of tumors in domestic animals. **World Health Organization**, Geneva, p. 26-32, 1980.

PAOLONI, M. C.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 8, p. 147-56, 2008.

PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 89, n. 509, p. 10-29, 1994.

PÉREZ-ALENZA, M. D.; RUTTEMAN, G. R.; PEÑA, L.; BEYNEN, A. C., CUESTA, P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. **The Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 3, n. 12, p. 132-139, 1998.

PHILIBERT, J. C.; SNYDER, P. W.; GLICKMAN, N.; GLICKMAN, L. T.; KNAPP, D. W. E.; WATERS, D. J. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. **The Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 17, p. 102-106, 2003.

PIRES, M. A.; TRAVASSOS, F. S.; PIRES, I. Neoplasias em canídeos – Um estudo descritivo de 6 anos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, n. 547, p. 111-118, 2003.

PLOTNIKOFF, N. P.; MILLER, G. C.; NIMEH, N.; FAITH, R. E.; MURGO, A. J.; WYBRAN, J. Enkephalins and T-cell enhancement in normal volunteers and cancer patients. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 496, p. 608–619, 1987.

QUEIROGA, F. L.; RAPOSO, T.; CARVALHO, M. I.; PRADA, J.; PIRES, I. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. **In Vivo**, v. 3, n. 25, p. 455-65, 2011.

QUEIROGA, F.; LOPES C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 97, n. 543, p. 2119-2127, 2002.

REID, J.; WISEMAN-ORR, M. L.; SCOTT, E. M.; NOLAN A. M. Development, validation and reliability of a web-based questionnaire to measure health-related quality of life in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 54, p. 227–233, 2013.

REIS-FILHO, J. S.; MILANEZI, F.; CARVALHO, S.; SIMPSON, P. T.; STEELE, D.; SAVAGE, K.; LAMBROS, M. B.; PEREIRA, E. M.; NESLAND, J. M.; LAKHANI, S. R.; SCHMITT, F. C. Metaplastic breast carcinomas exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. **Breast Cancer Research**, n. 7, p. 1028-1035, 2005.

RIBEIRO, L. G. R.; ESTRELA-LIMA, A.; COSTA NETO, J. M.; MOREIRA, E. L. T.; CARVALHO, R. D. S.; D'ASSIS, M. J. M. H.; MARTINS FILHO, E. F.; CASSALI G. D. Carcinoma inflamatório de mama com metástase intracraniana em cadela - relato de caso. **Revista Clínica Veterinária**, v. 103, p. 82-90, 2013.

RIBEIRO, L. G. R.; ESTRELA-LIMA, A.; COSTA NETO, J.M.; ORIA, A. P.; MOREIRA, E. L. T.; DAMASCENO, K.A.; D ASSIS, M. J. M. H.; COSTA, A. T.; CASSALI, G. D. Clinical, pathological and prognostic data from 37 female dogs with inflammatory mammary carcinoma. **Online Journal of Veterinary Research**, v. 19, p. 1-14, 2015.

RICHARDS, H. G.; MCNEIL, P. E.; THOMPSON, H.; REID, S. W. An epidemiological analysis of a canine-biopsies database compiled by a diagnostic histopathology service. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 51, p. 125-136, 2001.

RIVERA, P.; VON EULER, H. Molecular Biological Aspects on Canine and Human Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 132-146, 2011.

ROCHA RIBEIRO, L. G.; ESTRELA-LIMA, A.; COSTA NETO, J. M.; PONTES ORIÁ, A.; TRINDADE MOREIRA, E. L.; DAMASCENO, K. A.; MELHOR HEINE D'ASSIS, M. J.; COSTA, A. T.; DANTAS CASSALI, G. Clinical, pathological and prognostic data from 37 female dogs with inflammatory mammary carcinoma. **Online journal of Veterinary Research**, v. 19, n. 1, p. 1-14, 2015.

RODASKI, S.; DE NARDI, A. B. Classificação dos quimioterápicos. In: \_\_\_\_\_ **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. São Paulo: Med Vet, p. 67-75, 2008.

RODASKI, S.; PIEKARZ, C. H. Epidemiologia e etiologia do câncer. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, p. 1-22, 2009.

ROSE, D. P.; KOMNINO, D.; STEPHENSON, G. D. Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. **Obesity Reviews**, n. 5, v. 3, p. 153-65. 2004.

SAYYAH, M.; SHARIFI, M.; ROKNI, P. L. Comparação de bem-estar geral dos pacientes submetidos à terapia de manutenção com metadona (MMT) em pacientes submetidos a terapia Naltrexone. **J Irã Saúde Pública**, v. 42, n. 2, p. 145-148, 2013.

SCHINDLER, T. H.; CARDENAS, J.; PRIOR, J. O.; FACTA, A. D.; KRIESSL, M. C.; ZHANG, X. L.; SAYRE, J.; SHOFR, F. S.; SONNENSCHNEIN, E. G.; GOLDSCHMIDT, M. H.; LASTER, L. L.; GLICKMAN, L. T. Histopathologic and dietary prognostic factors for canine mammary carcinoma. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 1, n. 13, p. 49-60, 1989.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. Factors influencing canine mammary cancer development and post surgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, n. 6, p. 1249-1261, 1969.

SÉVÈRE, S.; MARCHAND, P.; GUIFFARD, I.; MORIO, F.; VENISSEAU, A.; VEYRAND, B.; LE BIZEC, B.; ANTIGNAC, J. P.; ABADIE, J. Pollutants in pet dogs: a model for environmental links to breast cancer. **SpringerPlus**, v. 4, n. 27, 2015.

SHARAFADDINZADEH, N.; MOGHTADERI, A.; KASHIPAZHA, D.; MAJDINASAB, N.; SHALBAFAN, B. O. Efeito de naltrexona em baixa dose na qualidade de vida de pacientes com esclerose múltipla: um ensaio randomizado controlado com placebo. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 16, n. 8, p. 964-969, 2010.

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

SIRIVAIDYAPONG, S. Dogs with mammary gland tumors and the feeding dietary types. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION WORLD CONGRESS, 2003, **Proceedings...**, Bangkok, Thailand.

SMITH, J. P.; BINGAMAN, S. I.; RUGGIERO, F.; MAUGER, D. T.; MUKHERJEE, A.; MCGOVERN, C. O.; ZAGON, I. S. Therapy with the opioid antagonist naltrexone promotes mucosal healing in active Crohn's disease: a randomized placebo-controlled trial. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 56, n. 7, p. 2088-2097, 2011.

SOJKA, D. K., HUANG, Y. H., FOWELL, D. J. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. **Immunology**, v. 124, n. 1, p. 13-22, 2008.

SORENMO, K. U.; RASOTTO, R.; ZUPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M. H. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 1, n. 48, p. 85-97, 2011.

SORENMO, K.; SHOFER, F.; GOLDSCHMIDT, M. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.14, n.3, p. 266-270, 2000.

SOUZA, C. H. M; TOLEDO-PISA, E.; AMORIN, R.; BARBOZA, A.; TOBIAS, K. M. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 50, n. 5, p. 506-510, 2009.

STEIN, C.; LANG, J. L. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, p. 3-8, 2009.

STEIN, C.; SCHAFER, M.; MACHELSKA, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nature Medicine**, v. 9, n. 8, p. 1003-1008, 2003.

STEWART, T. H. M.; HEPPNER, G. H. Immunological enhancement of breast cancer. **Parasitology**, v. 115, p. 141-153, 1997.

STOCKHAUS, C.; KOHN, B.; RUDOLPH, R.; BRUNNBERG, L.; GIGER, U. Correlation of haemostatic abnormalities with tumor stage and characteristics in dogs with mammary carcinoma. **Journal of Small Animal Practice**, v. 40, p. 326-331, 1999.

TANG, Q.; BLUESTONE, J. A. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. **Nature Immunology**, v. 9, n. 3, p. 239-244, 2008.

TAVARES, W. L. F.; LAVALLE, G. E.; FIGUEIREDO, M. S.; SOUZA, A. G.; BERTAGNOLLI, A. C.; VIANA, F. A. B.; PAES, P. R. O.; CARNEIRO, R. A.; CAVALCANTI, G. A. O.; MELO, M. M.; CASSALI, G. D. Evaluation of dose and side effects of Tamoxifen in healthy female dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, n. 67, p. 1-6, 2010.

TEJWANI, G. A.; GUDEHITHLU, K. P.; HANISSIAN, S. H.; GIENAPP, I. E.; WHITACRE, C. C.; MALARKEY, W. B. Facilitation of dimethylbenz anthracene-induced rat mammary tumorigenesis by restraint stress, role of beta-endorphin, prolactin and naltrexone. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 4, p. 637-641, 1991.

TERRA, S. G.; TSUNODA, S. M. Os antagonistas opióides no tratamento de doença hepática colestática com prurido. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 32, p. 1228-1230, 1998.

THURÓCZY, J.; REISVAAG, G. J.; PERGE, E.; TIBOLD, A.; SZILÁGYI, J.; BALOGH, L. Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. **Journal Comparative Pathology**, v. 137, p. 122-129, 2007.

TODOROVA, I. Prevalence and etiology of the most common malignant tumours in dogs and cats. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 9, n. 2, p. 85–98, 2006.

TORÍBIO, J. M. M. L. **Caracterização clínica, classificação histopatológica e georreferenciamento das neoplasias mamárias em cadelas no município de Salvador**. 2008. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.

TSE, G. M.; TAN, P. H.; PUTTI, T. C.; LUI, P. C.; CHAIWUN, B.; LAW, B. K. Metaplastic carcinoma of the breast: a clinicopathological review. **Journal of Clinical Pathology**, n. 59, p. 1079-1083, 2006.

UVA, P.; AURISICCHIO, L.; WATTERS, J.; LOBODA, A.; KULKARNI, A.; CASTLE, J.; PALOMBO, F.; VITI, V.; MESITI, G.; ZAPPULLI, V.; MARCONATO, L.; ABRAMO, F.; CILIBERTO, G.; LAHM, A.; LA MONICA, N.; DE RINALDIS, E. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. **BMC Genomics**, v. 10, n. 135, p. 1-20, 2009.

VAN GARDEREN, E.; SCHALKEN, J. A. Morphogenetic and tumorigenic potentials of mammary growth hormone/growth hormone receptor system. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, p. 153-65, 2002.

WHEATE, N. J.; WALKER, A. S.; CRAIGA, A. G. E.; OUNA, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Show Affiliations Dalton Trans**, v. 39, p. 8113-8127, 2010.

WILLETT, W. Diet and Cancer. **The Oncologist**, v. 5, p. 393-404, 2000.

WISEMAN-ORR, M. L.; SCOTT, E. M.; REID, J.; NOLAN, A. M. Validation of a structured questionnaire as an instrument to measure chronic pain in dogs on the basis of effects on health-related quality of life. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, p. 1826-1836, 2006.

YAZBEK, K. V. B. Avaliação da dor e da qualidade de vida em cães com câncer. **Revista Dor**, v. 9, n. 3, p. 1297-1304, 2008.

YAZBEK, K. V.; FANTONI, D. T. Validity of a health-related quality-of-life scale for dogs with signs of pain secondary to cancer. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 226, p. 1354-1358, 2005.

YAZIJI, H.; GOLDSTEIN, L. C.; BARRY, T. S. WERLING, R.; HWANG, H.; ELLIS, G. K.; GRALOW, J. R.; LIVINGSTON, R. B.; GOWN, A. M. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. **JAMA**, v. 291, p. 1972-1977, 2004.

ZAGON, I. S.; MC LAUGHLIN, P. J. Naltrexone modulates tumor response in mice with neuroblastoma. **Science**, v. 22, n. 1, p. 671-672, 1983.

ZAGON, I. S.; MCLAUGHLIN, P. J. Opioids and differentiation in human cancer cells. **Neuropeptides**, v. 39, n. 5, p. 495-505, 2005.

ZAGON, I. S.; DONAHUE, R. N.; ROGOSNITZKY, M.; MCLAUGHLIN, P. J. Imiquimod upregulates the opioid growth factor receptor to inhibit cell proliferation independent of immune function. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 8, p. 968-979, 2008.

## 10. ANEXOS

### Anexo 1: Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, em reunião do dia 14 de junho de 2013 aprovou o parecer de protocolo 10/2013 e certifica que o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do efeito de baixas doses de naltrexona (LDN) sobre a resposta imune de cadelas com carcinoma mamário submetidas ou não ao tratamento quimioterápico com carboplatina", sob a coordenação da professora Alessandra Estrela da Silva Lima, está de acordo com os princípios de ética e bem-estar animal.

Salvador, 21 de junho de 2013.

  
Lúcio Leopoldo Aragão da Silva  
Coordenador da CEUA-MEVZ

**Anexo 2:** Ficha para exame clínico de tumores mamários caninos

**FICHA CLÍNICA DE ACOMPANHAMENTO DE CADELAS COM NEOPLASIAS  
MAMÁRIAS**

RG: \_\_\_\_\_ RG projeto: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Histo: \_\_\_\_\_ Cito: \_\_\_\_\_ Raio-X: \_\_\_\_\_

Proprietário: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Espécie: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

Sexo:  Macho  Fêmea Pelagem: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Porte:  Pequeno (até 35cm) Peso: \_\_\_\_\_

FC: \_\_\_\_\_ FR: \_\_\_\_\_  Médio (36-46cm) Condição corporal:  Magro

Mucosas: \_\_\_\_\_ TPC: \_\_\_\_\_  Grande (acima 46cm)  Normal

Alimentação:  Ração  Comida caseira  Ração + Comida caseira  Obeso

Ambiente: \_\_\_\_\_

Antecedentes genéticos: \_\_\_\_\_

Vacinação: Anti-rábica  Sim  Não Quando/Qual: \_\_\_\_\_

Outras  Sim  Não Quando/Qual: \_\_\_\_\_

Vermifugação:  Sim  Não Quando/Qual: \_\_\_\_\_

Doenças anteriores e atuais: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tomando medicamento:  Sim  Não Qual/Tempo: \_\_\_\_\_

Anticoncepcional:  Sim  Não Quanto/Qual: \_\_\_\_\_ Última data: \_\_\_\_\_

Cio Regular:  Sim  Não Último (data): \_\_\_\_\_

Castrada:  Sim  Não Idade: \_\_\_\_\_

Pseudo-gestação:  Regulares  Intermitentes  Não

Partos:  Sim  Não Quantos: \_\_\_\_\_ Último: \_\_\_\_\_

Aborto:  Sim  Não Quantos: \_\_\_\_\_ Último: \_\_\_\_\_

Já cruzou e não emprenhou:  Sim  Não

Secreção vaginal:  Sim  Não Quando/Intensidade: \_\_\_\_\_

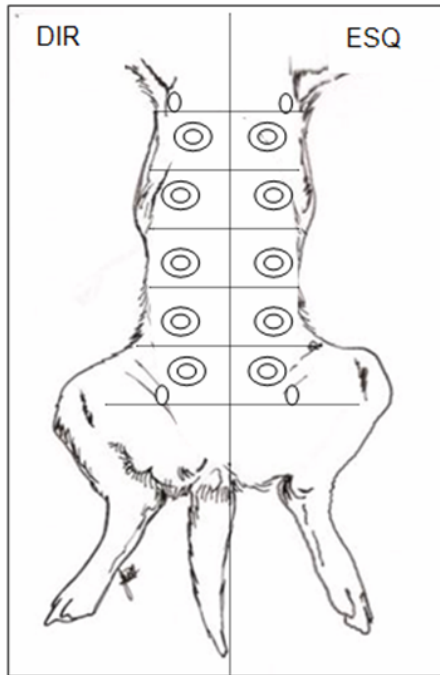
Características do(s) tumor(s):

Integra  Ulcerada  Cística



Mamas acometidas: (Esquema)

Exames solicitados:.....



Marcar com um X o tamanho correspondente:

M1D - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M2D - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M3D - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M4D - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M5D - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M1E - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M2E - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M3E - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M4E - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M5E - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

Outro local: .....

Consistência: .....

Secreção: Sim  Não  .....

Edema de membros: Sim  Qual(is)? ..... Não

Linfonodos infartados: Sim  Qual(is)? ..... Não

Veterinário resp: ..... Data: ...../...../.....

**Anexo 3:** Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas de mama da cadela (modificado de OWEN, 1980)

**Tumor Primário (T)**

**T0** Tumor não detectável

**T1** Tumor < 3 cm

a : não fixo

b : fixo à Pele

c : fixo ao Músculo

**T2** Tumor de 3 – 5 cm

a : não fixo

b : fixo à Pele

c : fixo ao músculo

**T3** Tumor > 5 cm

a : não fixo

b : fixo à Pele

c : fixo ao músculo

**T4** Tumor de qualquer tamanho

**Linfonodos Regionais (N)**

**N0** Sem evidência de linfonodo regional (axilares ou inguinais)

**N1** Linfonodo Ipsilateral envolvido

a : não fixo

b : fixo

**N2** Linfonodos bilaterais envolvidos

a : não fixo

b : fixo

**Metástases à Distância (M)**

**M0** Sem evidência de metástase distante



**M1** Com metástase à distância

**Agrupamento por estádios**

Estadiamento	T	N	M
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
Estadio IV	T1; T2; T3	N1	M0
Estadio V	T1; T2; T3	N0; N1	M1

T – Tamanho do tumor primário; N – Linfonodo; M – Metástase  
(FONTE: Calvacanti e Cassali, 2006, modificado de Owen, 1980)

**Anexo 4: Ficha de exame necroscópico - Laboratório de Patologia Veterinária (UFBA)**

	UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA HOSPITAL DE MEDICINA VETERINÁRIA "PROF. RENATO MEDEIROS NETTO" LABORATÓRIO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA (LPV-UFBA) Av. Adhemar de Barros, 500 – Ondina, Salvador (BA), 40170-110 Tel: (71) 3283-6739		
<b>FICHA DE EXAME NECROSCÓPICO</b>			
ESPÉCIE	NOME	RAÇA	REGISTRO
IDADE	SEXO	PELAGEM	
PORTE	PROCEDÊNCIA		
ENDEREÇO		DATA E HORA: DO ÓBITO DO INÍCIO E FIM DA NECROPSIA	

**ANAMNESE/HISTÓRICO CLÍNICO/ DADOS EPIZOOTIOLÓGICOS:**

Aula prática  
 Laudo  
 IC

**SUSPEITA/DIAGNÓSTICO CLÍNICO:**

ESTADO NUTRICIONAL:

PELE/PÊLOS:

OLHOS:

BOCA:

NARINAS:

ORELHAS:

MUCOSAS:

VULVA/PREPÚCIO:

ÂNUS:

TECIDO SUBCUTÂNEO:

LINFONODOS SUPERFICIAIS:

FARINGE/LARINGE:

TIREÓIDES/PARATIREÓIDES:

PLEURA E CAVIDADE TORÁCICA:

ESÔFAGO:

TRAQUÉIA:

PULMÃO:

CORAÇÃO:

PERITÔNIO E CAVIDADE ABDOMINAL:

FÍGADO:

OMENTO:

BAÇO:

PÂNCREAS:

ADRENAL:

RINS:

BEXIGA:

ESTÔMAGO:

RÚMEN:

RETÍCULO:

OMASO:

ABOMASO:

LINFONODOS MESENTÉRICOS:

DUODENO:

JEJUNO:

ÍLEO:

CECO:

CÓLON:

RETO:

SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO/FEMININO:

GLÂNDULA MAMÁRIA:

OSSOS:

MÚSCULOS:

ARTICULAÇÕES:

SNC:

OUTRAS OBSERVAÇÕES:

ALTERAÇÕES CADAVERÍCAS:

MATERIAL COLETADO:

DIAGNÓSTICO(S) ETIOLÓGICO/MORFOLÓGICO(S)

*Veterinário (s) Responsável (veis)*

**Anexo 5:** Termo de doação do corpo do animal - Laboratório de Patologia Veterinária (UFBA)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
HOSPITAL DE MEDICINA VETERINÁRIA

TERMO DE DOAÇÃO

Pelo presente termo, eu \_\_\_\_\_,  
RG \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_,  
endereço \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ ,  
faço a doação do corpo a este Hospital Veterinário do animal da espécie  
\_\_\_\_\_, raça \_\_\_\_\_, sexo \_\_\_\_\_, pelagem  
\_\_\_\_\_, nome \_\_\_\_\_, idade \_\_\_\_\_, para que esta  
instituição utilize-o para realização da necropsia em aulas práticas ou projetos de  
pesquisa.

Salvador, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do doador

**Obs:** Anexar a Ficha Histórico/Laudo Técnico emitida pelo Médico Veterinário

\_\_\_\_\_  
Av. Adhemar de Barros, 500 – Ondina  
Tel: (71) 3283-6738  
Email: [hospmcv@ufba.br](mailto:hospmcv@ufba.br)

**Anexo 6:** Questionário para avaliação da qualidade de vida de cadelas com neoplasia mamária (YAZBEK e FANTONI, 2005)

<b>TABELA 1 – Escala para avaliação da qualidade de vida validada para cães com câncer e dor<sup>27</sup></b> (zero – pior QV / 36 – melhor QV)		
<p><b>1. Você acha que a doença atrapalha a vida do seu animal?</b>            0.( ) muitíssimo            1.( ) muito            2.( ) um pouco            3.( ) não</p>	<p><b>5. Você acha que o seu animal sente dor?</b>            0.( ) sempre            1.( ) freqüentemente            2.( ) raramente            3.( ) nunca</p>	<p><b>9. O seu animal tem vômitos?</b>            0.( ) sempre            1.( ) freqüentemente            2.( ) raramente            3.( ) não</p>
<p><b>2. O seu animal continua fazendo as coisas que gosta (brincar, passear...)?</b>            0.( ) nunca mais fez            1.( ) raramente            2.( ) freqüentemente            3.( ) normalmente</p>	<p><b>6. O seu animal tem apetite?</b>            0.( ) não            1.( ) só come forçado/só o que gosta            2.( ) pouco            3.( ) normal</p>	<p><b>10. Como está o intestino do seu animal?</b>            0.( ) péssimo/funciona com dificuldade            1.( ) ruim            2.( ) quase normal            3.( ) normal</p>
<p><b>3. Como está temperamento do seu animal?</b>            0.( ) totalmente alterado            1.( ) alguns episódios de alteração            2.( ) mudou pouco            3.( ) normal</p>	<p><b>7. O seu animal se cansa facilmente?</b>            0.( ) sempre            1.( ) freqüentemente            2.( ) raramente            3.( ) está normal</p>	<p><b>11. O seu animal é capaz de se posicionar sozinho para fazer xixi e cocô?</b>            0.( ) nunca mais conseguiu            1.( ) raramente consegue            2.( ) às vezes consegue            3.( ) consegue normalmente</p>
<p><b>4. O seu animal manteve os hábitos de higiene (lamber-se, p. ex.)?</b>            0.( ) não            1.( ) raramente            2.( ) menos que antes            3.( ) está normal</p>	<p><b>8. Como está o sono do seu animal?</b>            0.( ) muito ruim            1.( ) ruim            2.( ) bom            3.( ) normal</p>	<p><b>12. Quanta atenção o animal está dando para a família?</b>            0.( ) está indiferente            1.( ) pouca atenção            2.( ) aumentou muito (carência)            3.( ) não mudou/está normal</p>

**Anexo 7:** Características clínicas e histopatológicas dos carcinomas em tumores mistos benignos após o tratamento estabelecido. SRD: Sem raça definida.

Caso	Idade anos	Raça	Condição corporal	T	N	M	Quimioterapia (sessões)	Sobrevida
1	9	SRD	magra	3-5cm	não	sim	não	150
2	6	Cocker Spaniel	normal	3-5cm	não	sim	não	90
3	14	Poodle	normal	> 5cm	não	sim	não	90
4	12	Pinscher	normal	> 5cm	não	não	não	150
5	11	Poodle	normal	> 5cm	não	não	não	150
6	15	Poodle	obesa	> 5cm	sim	sim	não	90
7	10	SRD	normal	3-5cm	sim	sim	não	60
8	7	Pastor Alemão	normal	> 5cm	sim	não	não	180
9	12	Poodle	obesa	> 5cm	sim	sim	não	120
10	8	Poodle	normal	3-5cm	sim	não	não	150
11	14	SRD	normal	> 5cm	não	não	6	300
12	13	Poodle	magra	3-5cm	não	sim	1	60
13	18	Poodle	normal	> 5cm	não	sim	4	160
14	12	SRD	obesa	3-5cm	não	não	6	180
15	13	Poodle	normal	> 5cm	não	não	6	250
16	8	Cocker Spaniel	normal	> 5cm	não	não	6	250
17	11	Poodle	normal	3-5cm	não	não	6	540
18	9	SRD	normal	> 5cm	não	não	6	610
19	10	Poodle	obesa	> 5cm	não	não	6	540
20	16	Pinscher	normal	> 5cm	não	não	6	640
21	12	Poodle	normal	> 5cm	sim	sim	6	330
22	6	Poodle	normal	> 5cm	sim	sim	4	120
23	13	Pastor Alemão	normal	> 5cm	sim	não	6	390
24	5	SRD	obesa	3-5cm	sim	sim	1	60
25	13	Poodle	normal	> 5cm	sim	sim	6	150
26	11	Poodle	normal	> 5cm	sim	não	6	365
27	7	Cocker Spaniel	magra	> 5cm	sim	não	6	365
28	14	Pinscher	obesa	> 5cm	sim	não	6	575
29	10	Poodle	normal	> 5cm	sim	não	6	690
30	12	Pastor Alemão	normal	3-5cm	sim	não	6	670

