



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**TÉCNICAS ULTRASSONOGRÁFICAS DE ANÁLISE E CATEGORIZAÇÃO
DE NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA E SUA RELAÇÃO COM A
ANGIOGÊNESE**

DÉBORA MONTEIRO NAVARRO MARQUES DE OLIVEIRA

Recife

2017

DÉBORA MONTEIRO NAVARRO MARQUES DE OLIVEIRA

**TÉCNICAS ULTRASSONOGRÁFICAS DE ANÁLISE E CATEGORIZAÇÃO
DE NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA E SUA RELAÇÃO COM A
ANGIOGÊNESE**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal Tropical.

Orientadora: Prof^a Dr^a Aurea Wischral

Co-orientador: Prof^o Dr^o Fabiano Séllos Costa

Recife

2017

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

Débora Monteiro Navarro Marques de Oliveira

Data de aprovação: ___/___/_____

Prof^a. Dr^a. Aurea Wischral
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Orientadora

Prof. Dr^o. Fabiano Séllos Costa
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Avaliador

Prof. Dr^a. Andrea Alice Fonseca Oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Avaliadora

Prof^a. Dr^a. Daniela Maria Bastos de Souza
Universidade Federal de Rural Pernambuco
Avaliadora

Prof^a. Dr^a. Maria Juliana Coelho Dias da Silva Teixeira
Centro Universitário Maurício de Nassau
Avaliadora

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

(Simone de Beauvoir)

*Aos meus pais,
pois tudo o que tenho feito foi receber.*

Agradecimentos

*Aos meus amados pais, Aristides e Leila,
por me possibilitarem tantas conquistas profissionais e pessoais;*

*À minha querida orientadora Aurea,
que há tempos considero meu referencial como docente, tornou-se
muito mais do que meu exemplo, mas sim uma grande amiga.*

*Ao meu co-orientador Fabiano,
pela amizade e companheirismo diários, e a persistente leveza de
transformar dúvidas em aprendizado.*

*À minha eterna equipe, Diogo, Sandra e Suzana,
pela sorte de tê-los presentes ao meu lado ao longo dessa jornada.*

*Aos tutores das cadelas participantes, por sua confiança e
dedicação prestada ao tratamento das pacientes;*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -
CAPES - pelo apoio financeiro, viabilizando a realização deste
estudo.*

SUMÁRIO

1. Qualificação do Problema.....	pág. 14
2. Revisão de Literatura.....	pág. 17
2.1 Glândula Mamária.....	pág. 17
2.2 Tumor de Mama.....	pág. 18
2.3 Grau de Malignidade.....	pág. 20
2.4 Ultrassonografia Mamária.....	pág. 22
2.4.1 Categorização BI-RADS®.....	pág. 23
2.4.2 Histograma dos Níveis de Cinza.....	pág. 26
2.4.3 Ultrassonografia Doppler.....	pág. 27
2.5 Angiogênese e Fatores de Crescimento.....	pág. 29
2.5.1 Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF).....	pág. 30
2.5.2 Angiotensina (ANG).....	pág. 32
3. Objetivos.....	pág. 34
3.1 Geral.....	pág. 34
3.2 Específicos.....	pág. 34
4. Capítulos.....	pág. 35
Capítulo I - BI-RADS classification and gray level histogram of malignant mammary tumors in bitches	pág. 35
Capítulo II – Análise Dopplerfluxométrica e angiogênica de tumores mamários caninos.	pág. 52
5. Considerações Finais.....	pág. 67
6. Referências Bibliográficas.....	pág. 68
Apêndice 1.....	pág. 81
Apêndice 2.....	pág. 83
Apêndice 3.....	pág. 85
Apêndice 4.....	pág. 86
Anexo 1.....	pág. 88

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Distribuição das mamas em variadas espécies. (A) Porca; (B) Cadela; (C) Gata; (D) Mulher; (E) Vaca; (F) Ovelha e Cabra; (G) Égua (DYCE, 2004). pág. 17

CAPÍTULO I

- FIGURA 1 Imagens ultrassonográficas de tumores mamários caninos com variadas características imaginológicas. A) Massa ecogênica de ecotextura heterogênea; B) Massa de aspecto cavitário, apresentando ecogenicidade mista e ecotextura heterogênea; B) Ultrassonografia Doppler de nódulo mamário com presença de intensa vascularização interna e periférica. pág. 39
- FIGURA 2 A) Imagem ultrassonográfica com seleção de área de interesse correspondente à neoplasia mamária; B) Avaliação quantitativa da ecogenicidade e ecotextura tumoral mamária através de histograma dos níveis de cinza pág. 40

CAPÍTULO II

- FIGURA 1 A) Imagem ultrassonográfica de tumor de mama canino de aspecto cavitário, apresentando ecogenicidade mista e ecotextura heterogênea; B) Dopplerfluxometria do nódulo mamário com avaliação dos principais parâmetros hemodinâmicos da lesão. pág. 55
- FIGURA 2 Ressecção cirúrgica de neoformação mamária ulcerada (A). Imagens B, C e D demonstram respectivamente a mensuração de largura, comprimento e altura da massa tumoral. pág. 56
- FIGURA 3 Médias e desvio padrão da expressão dos genes avaliados em tumores mamários de origem epitelial e mesenquimal de cadelas. pág. 60

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 Representação da graduação histológica de malignidade de tumores mamários humanos, segundo Elston e Ellis (1998) pág. 21
- TABELA 2 Aspectos ultrassonográficos das lesões mamárias analisadas pelo sistema BI-RADS[®] de classificação (AMERICAN COLLEGE OF RADYODOLOGY, 2013) pág. 24
- TABELA 3 Categorias de avaliação Léxico BI-RADS[®] e condutas terapêuticas sugeridas (AMERICAN COLLEGE OF RADYODOLOGY, 2013). pág. 25

CAPÍTULO I

- TABELA 1 Léxico BI-RADS modificado de classificação ultrassonográfica de tumores mamários caninos, com respectivas condutas terapêuticas sugeridas e percentual de malignidade esperado pág. 39
- TABELA 2 Descrição histopatológica dos tumores mamários caninos e suas respectivas frequências. pág. 42
- TABELA 3 Frequência (%) de categorização BI-RADS de acordo com a classe tumoral pág. 42
- TABELA 4 Grau de malignidade, BI-RADS, média e desvio padrão das análises do histograma em tumores mamários de origem epitelial em cadelas. pág. 43
- TABELA 5 Grau de malignidade, BI-RADS e média e desvio padrão das análises do histograma em tumores mamários de origem mesenquimal em cadelas. pág. 45

CAPÍTULO II

TABELA 1	Sequência dos oligonucleotídeos usados para a amplificação de cada gene em reações de PCR Real-Time	pág. 58
TABELA 2	Médias e desvio padrão dos dados Dopplerfluxométricos de tumores mamários de origem epitelial e mesenquimal em cadelas	pág. 60

LISTA DE ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

BI-RADS[®] – *Breast Imaging Reporting Data System*

ACR – *American College of Radiology*

ANG II – Angiotensina II

ATR1 – receptor 1 da angiotensina II

CEUA - comissão de ética para uso de animais

cm – centímetros

DNA – ácido desoxirribonucleico

ED – velocidade diastólica final

FLT-1 – receptor 1 do VEGF

FLK-1 – receptor 2 do VEGF

g - gramas

IP – índice de pulsatilidade

IR – índice de resistividade

Kg – quilogramas

mL - mililitro

Modo-B – modo bidimensional

RNA – ácido ribonucleico

PS – velocidade de pico sistólico

S/D – relação sístole / diástole

TAMAX – velocidade média do ciclo

UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

μL - microlitro

RESUMO

TÉCNICAS ULTRASSONOGRÁFICAS DE ANÁLISE E CATEGORIZAÇÃO DE NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA E SUA RELAÇÃO COM A ANGIOGÊNESE

Foram determinadas características imagiológicas de neoplasias mamárias e sua relação com a expressão relativa dos genes do VEGF e seus receptores (FLT-1 e FLK-1) e do receptor da angiotensina II (ATR1). Foram realizadas ultrassonografias das neoplasias de 30 cadelas utilizando a técnica de Dopplerfluxometria, histograma dos níveis de cinza, e classificação BI-RADS®. Foram coletadas amostras do tecido neoplásico para análise histopatológica e da expressão gênica. A malignidade dos tumores foi classificada em graus 1 (n = 9), 2 (n = 12) e 3 (n = 3) e demonstrou correlação positiva com o BI-RADS ($r = 0.55$; $P < 0.05$) e com a largura de base do histograma ($r = 0.42$, $P < 0.05$). A classificação BI-RADS apresentou correlação positiva com ecotextura (desvio padrão da média da ecogenicidade - $r = 0,66$, $P < 0,05$ e largura de base - $r = 0,55$, $P < 0,05$). Os receptores FLT-1 e FLK-1 apresentaram correlação positiva com as variáveis PS e PI, enquanto que o VEGF apresentou correlação positiva com PI, FLT-1 e FLK-1. O FLT-1 e FLK-1 apresentaram correlação positiva entre si, e com o ATR1. A expressão do VEGF foi maior nos tumores epiteliais do que nos mesenquimais. Concluiu-se que o método BI-RADS e a ecotextura do histograma tem relação com o grau de malignidade tumoral. A expressão do VEGF e seus receptores caracterizaram a neovascularização de tumores malignos, independente do tipo tumoral, porém a maior expressão do VEGF em tumores epiteliais pode auxiliar na caracterização de neoplasias mamárias malignas em cadelas.

Palavras-chave: Tumor de mama, BI-RADS, histograma, Doppler, VEGF, ANG II.

ABSTRACT

ULTRASONOGRAPHIC TECHNIQUES FOR ANALYSIS AND CATEGORIZATION OF CANINE MAMMARY NEOPLASIA AND ITS RELATION WITH ANGIOGENESIS

Were determined imaging characteristics of breast neoplasms and their relation to the relative expression of VEGF genes and their receptors (FLT-1 and FLK-1) and angiotensin II receptor (ATR1). Ultrasonography of 30 canine neoplasms was performed using Dopplerfluxometry, gray level histogram, and BI-RADS® classification. Neoplastic tissue samples were collected for histopathological analysis and gene expression. Tumor malignancy was classified as grade 1 (n = 9), 2 (n = 12) and 3 (n = 3) and showed a positive correlation with BI-RADS ($r = 0.55$, $P < 0.05$) and with grey-level histogram width ($r = 0.42$, $P < 0.05$). The BI-RADS classification showed a positive correlation with ecotexture (standard deviation of mean echogenicity - $r = 0.66$, $P < 0.05$ and baseline width - $r = 0.55$, $P < 0.05$). The BI-RADS classification showed a positive correlation with ecotexture (standard deviation of mean echogenicity - $r = 0.66$, $P < 0.05$ and grey-level histogram width - $r = 0.55$, $P < 0.05$). The FLT-1 and FLK-1 receptors showed a positive correlation with the PS and PI, whereas VEGF showed a positive correlation with PI, FLT-1 and FLK-1. FLT-1 and FLK-1 showed positive correlation with each other, and with ATR1. VEGF expression was higher in epithelial tumors than in mesenchymal tumors. It was concluded that the BI-RADS method and the histogram echotexture are related to the degree of tumor malignancy. The expression of VEGF and its receptors characterized neovascularization of malignant tumors, regardless of tumor type, but the greater expression of VEGF in epithelial tumors may help in the characterization of malignant mammary neoplasias in bitches.

Key-words: Breast tumor, BI-RADS, histogram, Doppler, VEGF, ANG II.

1. QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA

Tumor mamário canino é considerado a neoplasia mais comum em cadelas não castradas, atingindo uma taxa média superior a 50% dos tumores que acometem fêmeas desta espécie (SLEECKX et al., 2011; FELICIANO, 2012a).

A ultrassonografia está entre as técnicas que permitem a avaliação de tumores mamários (NYMAN et al., 2006a). Este método de diagnóstico é descrito como uma técnica muito útil na avaliação de toda a glândula mamária, permitindo a determinação do tamanho, forma e irregularidade de borda de tumores (BAŞTAN et al., 2009). A ultrassonografia não está isenta, no entanto, de subjetividade já que trata-se de uma avaliação operador-dependente.

Visando a redução de análises inconclusivas o Colégio Americano de Radiologia (ACR) desenvolveu um sistema de classificação e padronização dos laudos, denominado *Breast Imaging and Reporting Data System* (BI-RADS®) (AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY, 1993), que possibilita uma avaliação quanto à evolução diagnóstica de nódulos mamários, e conseqüentemente uma recomendação da conduta clínico/cirúrgica (CALAS et al., 2007). O BI-RADS®, utilizado inicialmente para avaliações de tumores mamários de mulheres, apenas recentemente foi adaptado para uso em cadelas (MOHAMMED et al., 2011; SOUZA, 2012).

Apesar da padronização permitida pela técnica, a ferramenta BI-RADS® não se apresenta isenta de subjetividade em sua avaliação de forma que novos métodos, visando análises quantitativas, tem sido propostos para auxiliar na redução da dependência do operador (CALAS et al., 2007).

Avaliações quanto à ecogenicidade interna e ecotextura das massas podem ser realizadas pelo método ultrassonográfico de histograma dos níveis de cinza, onde tais parâmetros são avaliados quantitativamente, demonstrando a distribuição de frequência a partir da intensidade do eco na região de interesse, e mensurando a quantidade de níveis de cinza (MAEDA et al., 1998; LEE et al., 2006). No entanto, a aplicação da ultrassonografia na rotina oncológica de pacientes ainda tem sido restrita, na sua maioria, à medicina humana. Os estudos já realizados ainda são limitados sobre as características imaginológicas de tumores mamários caninos, havendo a necessidade de determinação de parâmetros ultrassonográficos e Dopplerfluxométricos nestas espécies (FELICIANO et al., 2012b).

O estudo Doppler é uma ferramenta diagnóstica recente na medicina veterinária, que permite a obtenção de informações em tempo real, sobre variados aspectos hemodinâmicos dos vasos, como a presença, a direção e o tipo de fluxo sanguíneo (SILVA et al., 2011). Em virtude do crescimento tumoral estar diretamente relacionado com a atividade de fatores promotores da neovascularização, o estudo da hemodinâmica e das características angiogênicas envolvidas recebem considerável atenção nas avaliações oncológicas (LUCENA, 2006).

Uma vasta gama de fatores de crescimento já foram identificados como promotores ou inibidores da angiogênese (STOUFFER et al., 2001; RIBATTI et al., 2002), dentre os quais pode-se citar a Angiotensina II (ANG II) e o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) como estimuladores da formação de vasos sanguíneos (FELICIANO et al., 2012b).

O ANG II é o peptídeo biologicamente ativo do sistema renina - angiotensina, constituindo um regulador importante da homeostase cardiovascular, além de ser reconhecido como um potente mitógeno (DESHAYES e NAHMIAS, 2005). A ANG II também apresenta atuação em variados processos patológicos, sendo descrito como componente participativo da migração e proliferação celular, podendo estar envolvido em formações neoplásicas (NOUET e NAHMIAS, 2000). Seus receptores, ATR1 e ATR2, já foram identificados com incremento de sua expressão em mulheres com carcinoma mamário (De PAEPE et al., 2001; De PAEPE et al., 2002). Outros estudos constataram ainda que estes receptores atuam no aumento dos níveis de VEGF, sugerindo a atuação do ANG II na permeabilidade vascular (RIZKALLA et al., 2003; ZHANG et al., 2004).

O Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), também chamado de Fator de Permeabilidade Vascular (VPF) é considerado como um importante mitógeno de células endoteliais e tem sido o fator pró-angiogênico mais estudado na oncologia humana (CHARNOCK- JONES et al., 2004; REBÊLO, 2009). O aumento da expressão de VEGF tem sido correlacionado com o aumento do risco de metástase em variados tumores humanos, entre eles as neoformações do tecido mamário (SCHOEFFNER et al., 2005; PAVLAKIS et al., 2008). Na medicina veterinária, no entanto, apenas estudos mais recentes tem se dedicado na avaliação do VEGF na rotina oncológica dos animais de companhia, havendo escassas informações referentes à relação entre a expressão gênica deste fator e características hemodinâmicas destas espécies.

As escassas informações sobre os mecanismos que regulam tais fatores, assim como, a inexistência de valores de referência imaginológicos sobre os aspectos fisiopatológicos e hemodinâmicos dos tumores mamários caninos, justificam a relevância do presente projeto de pesquisa. Face ao exposto e tendo a análise histopatológica como padrão ouro para a tipificação do processo neoplásico, objetivou-se neste estudo analisar o aspecto ultrassonográfico de neoplasias mamárias em cadelas e relacionar estes achados com a expressão de fatores angiogênicos, visando aumentar a precisão na diferenciação ultrassonográfica das massas neoplásicas e melhor orientação da conduta terapêutica.

2.1 GLÂNDULA MAMÁRIA

As mamas são glândulas sudoríparas modificadas e extensas, cujo tecido é sustentado e envolvido por um esqueleto de tecido fibroso e gorduroso no qual correm vasos e nervos (DYCE, 2004). São constituídas por lóbulos que contêm ramificações as quais terminam em pequenos ácinos dispostos em forma de cacho de uva (COTRAN et al., 1996). Estes lóbulos encontram-se separados entre si por septos de tecido conjuntivo denso e por tecido adiposo que drenam a secreção láctea para um ducto excretor, chamado de interlobular. Os ductos interlobulares por sua vez unem-se para formar o ducto lactífero ou galactóforo, responsável por coletar toda a secreção do lobo correspondente, direcionando-a para os mamilos (PELETEIRO, 1994; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O número de glândulas mamárias, assim como sua distribuição ventral apresenta grande variação entre as espécies domésticas (Figura 1).

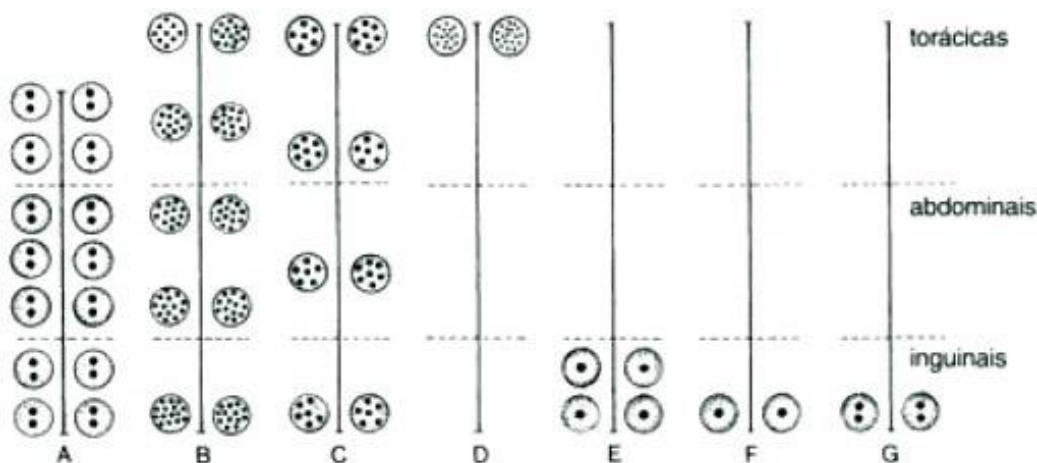


Figura 1: Distribuição das mamas em variadas espécies. (A) Porca; (B) Cadela; (C) Gata; (D) Mulher; (E) Vaca; (F) Ovelha e Cabra; (G) Égua. (DYCE, 2004).

Nas cadelas as mamas estão dispostas em duas cadeias mamárias bilaterais simétricas que se estendem desde o tórax ventral até à região inguinal, sendo as mamas denominadas classicamente em torácica cranial (M1) e caudal (M2), abdominal cranial (M3) e caudal (M4) e inguinal (M5) (PATSIKAS et al., 2006; REESE et al., 2011).

Características vasculares das mamas caninas divergem essencialmente sobre a origem do suprimento arterial fornecido para cada par de glândulas mamárias. As mamas torácicas são irrigadas pelos ramos esternais das artérias internas, intercostais e torácicas laterais; as mamas abdominais craniais supridas pela vascularização da artéria epigástrica cranial; e as mamas abdominais caudais e inguinais pela artéria epigástrica caudal, epigástrica profunda cranial, abdominal segmentada e íliaca circunflexa profunda (REESE et al., 2011; SOUZA, 2012).

Outro aspecto anátomo-topográfico de destaque das avaliações mamárias, relaciona-se às altas concentrações de receptores hormonais nos diferentes pares, uma vez que quanto maior o número de receptores ativos, evidencia-se uma maior probabilidade de desenvolvimento de neoplasias (KUMARAGURUPARAN et al., 2006; COSTA, 2010). Outros fatores epidemiológicos relacionados à predisposição de desenvolvimento de tumores mamários têm sido descritos na rotina de monitoramento oncológico de cadelas (COSTA, 2010).

2.2 TUMOR DE MAMA

Estudos oncológicos de cães têm assumido destacada importância diante de uma mais recente exigência dos tutores sobre a assistência terapêutica oferecida aos seus animais, assim como pela alta incidência de processos neoplásicos desta espécie (CARVALHO, 2006). O tumor mamário de cadelas é considerado o mais frequente entre as neoplasias que acometem fêmeas caninas, alcançando um percentual aproximado de 52% (De NARDI et al., 2002; FELICIANO et al., 2012a), seguido de percentuais variados para tumores cutâneos (De NARDI et al., 2002; NATIVIDADE et al., 2014).

O destaque dado ao estudo de neoplasias mamárias deve-se também à similaridade existente com variadas características do tumor de mama de mulheres (MOHAMMED et al., 2011; FELICIANO et al., 2012a; SHAFIEE et al., 2013; CASSALI et al., 2014), tendo sido descritas desde semelhanças epidemiológicas e clínico-morfológicas, até características de evolução prognóstica similares (VAIL e MACEWEN, 2000; SHAFIEE et al., 2013). Entre elas, podem ser citadas o período de vida do surgimento das lesões, evolução clínica, predisposições hereditárias, efeito protetor da ovariectomia, padrões de expressão de receptores de estrogênio e progesterona, e até mesmo os

principais órgãos alvo de metástases (ANTUOFERMO et al., 2007; MOHAMMED et al., 2011).

Na espécie canina os tumores mamários afetam na mesma proporção fêmeas inteiras ou castradas tardiamente, havendo maior incidência, no entanto, entre cadelas adultas a idosas (De NARDI et al, 2002). O aumento na incidência desta afecção em cadelas está, portanto, possivelmente relacionado ao aumento da expectativa média de vida observada nas últimas décadas (THURÓCZY et al., 2007; COSTA, 2010).

Em sua maioria, tumores mamários caninos apresentam-se macroscopicamente como lesões circunscritas, de textura consistente e móveis em relação aos tecidos e músculos adjacentes (MISDORP et al., 1999; CASSALI et al., 2014). A depender do tipo histológico da neoplasia, os nódulos podem apresentar-se ulcerados e/ou cobertos por pele e pelos, e ao corte apresentam aspecto sólido, cístico ou misto, onde também podem ser encontradas, frequentemente, áreas de isquemia, necrose e calcificações (COSTA, 2010). Quanto à distribuição das lesões nodulares, sabe-se que as principais glândulas acometidas são as abdominais caudais e as mamas inguinais, possivelmente por serem as que contêm maior quantidade de parênquima mamário (PELETEIRO et al., 1996; RUTTEMAN et al., 2001), com também maior atividade proliferativa em resposta ao estrógeno (MOULTON et al., 1970). É possível observar frequentemente mais de uma glândula mamária acometida, assim como o diagnóstico histológico de diferentes tipos tumorais em uma mesma mama, conferindo aos tumores mamários caninos características de neoplasias multicêntricas (PELETEIRO, 1994).

As dimensões dos nódulos mamários são consideradas um importante fator prognóstico em cadelas, dos quais tumores com três centímetros ou menos, apresentam significativa correlação com melhores prognósticos quando comparados a nodulações maiores (CASSALI et al., 2014). Em estudo sobre neoplasias benignas e malignas de cadelas, Ferreira et al. (2009) constataram que os nódulos mamários com dimensões acima de cinco centímetros foram predominantemente lesões malignas.

Os achados histopatológicos de malignidade nas lesões mamárias caninas, apresentam grande variação entre estudos, sendo descritos percentuais que variam de 50% (RUTTEMAN et al., 2001; SHAFIEE et al., 2013) até 93% dos casos (HASHIMOTO et al., 2002). A ampla variabilidade dos percentuais encontrados está possivelmente relacionada ao fato de tumores benignos serem, de certa forma, negligenciados em virtude de seus aspectos macroscópicos. Dentro do atendimento clínico, por vezes, a extirpação cirúrgica de nódulos pequenos é postergada, ou quando realizada precocemente, não é

acompanhada de análise histopatológica (BRODEY et al., 1983; PELETEIRO, 1994; MISDORP, 2002). Aproximadamente 26% de cadelas com tumores benignos, desenvolvem mais tardiamente tumores em outras glândulas mamárias (MORRIS et al., 1998), podendo tumores benignos e malignos se desenvolverem concomitantemente (MORRISSON, 1998; CASSALI et al., 2014).

Nódulos que apresentam crescimento delimitado e lento sugerem, mas não comprovam aspectos de benignidade, do mesmo modo que ausência de sinais de malignidade, não garantem a benignidade da lesão (MISDORP et al., 1999). Para confirmação do tipo tumoral existente faz-se necessária a realização de exame histopatológico (HENRY, 2010), classificação esta considerada a mais importante entre os fatores prognósticos de tumores de mama (MORRISSON, 1998; MISDORP, 2002).

A análise histopatológica pode ser realizada através de coleta de fragmento por biópsia, ou material coletado do próprio nódulo removido cirurgicamente. As amostras devem ser obtidas de vários pontos do tumor, contendo não só tecido tumoral, como também as áreas circunvizinhas correspondentes as zonas de transição. A partir dessa coleta torna-se possível avaliar o grau de invasão local, a reação inflamatória presente na lesão, assim como verificar se existem lesões de displasia mamária, que frequentemente podem estar associadas aos processos tumorais (PELETEIRO, 1994).

A análise histopatológica das lesões mamárias vem assumindo maior importância dentro do atendimento oncológico de cadelas, no entanto percebe-se ainda pontos controversos por se tratar de uma classificação de ampla complexidade, apresentando, sobretudo, divergências entre autores (CARVALHO, 2006) e entre as classificações internacionais (MISDORP et al., 1999; GOLDSCHMIDT et al., 2011) e nacionais (CASSALI et al., 2014).

2.3 GRADUAÇÃO DE MALIGNIDADE

A graduação histológica de malignidade foi desenvolvida objetivando-se a obtenção de um procedimento padrão de avaliação que servisse como importante parâmetro prognóstico das neoplasias mamárias (ELSTON e ELIS, 1991; CASSALI et al., 2014).

Variadas pesquisas propuseram diferentes métodos de graduação dos tumores mamários (GREENHOUGH, 1925; PATEY e SCARFF, 1928; HARTVEIT, 1971),

sendo o trabalho desenvolvido em Nottingham e modificado por Elston e Ellis (1998) o mais amplamente utilizado na medicina humana. Este trabalho baseia-se na avaliação da arquitetura e variações morfológicas da neoplasia, aspectos significativamente correlacionados com a agressividade tumoral (ELSTON e ELLIS, 1998; CASSALI et al., 2014).

Este método permite que critérios específicos possam ser avaliados sistematicamente utilizando-se parâmetros como o índice de formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem do número de mitoses por campo. Para cada um dos três parâmetros anteriormente citados, são conferidas pontuações que variam de um a três, de acordo com a análise histológica (Tabela 1).

Tabela 1: Representação da graduação histológica de malignidade de tumores mamários humanos, segundo Elston e Ellis (1998)

<i>Pontuação</i>	<i>Mitoses / campo*</i>	<i>Formações tubulares</i>	<i>Pleomorfismo nuclear</i>
1 ponto	0 - 8	≥ 75%	Pequeno e regular
2 pontos	9 - 16	10 – 75%	Moderada variação de tamanho e forma
3 pontos	≥ 17	≤ 10%	Alta variação de tamanho e forma

*Adaptado ao tamanho do campo de microscopia utilizado neste estudo = 0,55 mm. Objetiva 40x.

A graduação de malignidade é dada então pela soma dos pontos, podendo resultar em valores que variam de três a nove. Avaliações histológicas com resultado de três a cinco pontos, é classificada em grau I; pontuações entre seis e sete, recebem grau II; e resultados entre oito e nove recebem grau III (ELSTON e ELLIS, 1998; CASSALI et al., 2014).

Na medicina veterinária o sistema de classificação tumoral mais empregado na rotina de avaliação das neoplasias mamárias foi o proposto por Misdorp et al. (1999), baseado também em uma análise de características nucleares e celulares. Apenas mais recentemente a classe veterinária iniciou a aplicação da graduação de malignidade baseada nos trabalhos de Nottingham (CASSALI et al., 2014).

Os tumores malignos são, em sua maioria, altamente invasivos não respeitando as barreiras anatómicas e promovendo infiltração no tecido adjacente normal (COSTA,

2010). Estas neoplasias apresentam a capacidade de metastização, fenômeno que envolve uma série de eventos interdependentes onde ocorre transferência de células tumorais primárias para a membrana dos vasos linfáticos e/ou sanguíneos, promovendo subsequentemente a formação de colônias neoplásicas em órgãos à distância (SORENMO, 2003). Entre os locais de ocorrência de metástase de tumor mamário, observa-se os linfonodos regionais e pulmões como principais acometidos (PELETEIRO, 1994; FOSSUM, 2007), no entanto exames adicionais como a radiografia e ultrassonografia convencional devem ser realizados para rastreamento de demais sítios metastáticos em órgãos abdominais (CASSALI et al., 2014).

2.4 ULTRASSONOGRRAFIA MAMÁRIA

Os exames de imagem são fundamentais para a prática oncológica tanto para rastreamento do surgimento de tumores subsequentes, quanto para o seu diagnóstico inicial, estadiamento ou avaliação da sua evolução aos tratamentos instituídos (NYMAN et al., 2004). Trata-se de um exame indispensável para a rotina de avaliação mamária de pequenos animais, possibilitando a avaliação da glândula mamária e suas características anatômicas e ecográficas, assim como a obtenção de informações relativas a condições patológicas (PAYAN-CARREIRA e MARTINS-BESSA, 2008; SOUZA, 2012).

Estudos ultrassonográficos de mama canina tem sido realizados nas últimas décadas, tratando-se de um exame dinâmico e operador-dependente que necessita para a sua realização, não somente de ampla experiência por parte do ultrassonografista, como também de equipamento específico para adequada avaliação mamária (HOLEY et al., 2013). Por se tratar de uma estrutura superficial, a glândula mamária é avaliada por ultrassonografia convencional utilizando-se transdutor multifrequencial de alta resolução, possibilitando a identificação de lesões com dimensões inferiores a cinco milímetros (MOHAMMED et al., 2011).

Inicialmente a ultrassonografia foi utilizada para distinção entre lesões císticas e sólidas, caracterizando-se como um método complementar para a análise nodular, através das características de margens, arquitetura adjacente, padrões acústicos internos e periféricos, acometimento do linfonodo regional, presença de calcificações e vascularização (GONZALES de BULNES et al., 1998; NYMAN et al., 2006a; BASTAN et al., 2009). Apesar da amplitude de características possíveis de serem obtidas ao

ultrassom, as informações sobre as mamas caninas ainda são escassas sobre os aspectos de diferenciação tumoral (NYMAN et al., 2006a; FELICIANO, 2008).

Na medicina humana os nódulos mamários são avaliados por exame mamográfico e ultrassonográfico (SCHROEDER et al., 2003; SEHGAL et al., 2006), sendo a ultrassonografia o método utilizado rotineiramente para complementação diagnóstica de mamografias inconclusivas, ou como exame de eleição para mulheres com mamas densas (BARRAS et al., 2004). Na rotina de atendimento imagiológico de mulheres com neoplasia mamária é realizada ainda a classificação e categorização dos nódulos de acordo com o *Breast Imaging and Reporting Data System* (BI-RADS®) proposto e aperfeiçoado pelo *American College of Radiology* (AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY, 1993; 2003; 2013).

2.4.1 CATEGORIZAÇÃO BI-RADS®

O Sistema BI-RADS® de categorização foi desenvolvido em 1993 e se caracteriza pela primeira normatização dos laudos mamográficos acerca das avaliações neoplásicas de mama em mulheres (AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY, 1993). Esta padronização foi criada visando a obtenção de laudos com uniformidade das conclusões diagnósticas e sugestão de conduta terapêutica, promovendo melhorias na qualidade da assistência prestada. Sua aplicabilidade proporciona não somente a minimização de subjetividade das avaliações mamárias, como também incrementa os programas de rastreamento e a orientação da conduta terapêutica para cada caso (CHALA e BARROS, 2004; CAMARGO JÚNIOR, 2005; RAO et al., 2016).

O método em questão apresenta a sua análise baseada nas alterações mamárias encontradas (Tabela 2), sendo categorizadas a partir do Léxico BI-RADS® (Tabela 3), capaz de sugerir a diferenciação entre lesões benignas e malignas (MOHAMMED et al., 2011; SOUZA, 2012; RAO et al., 2016). A classificação BI-RADS® / Léxico BI-RADS® foi sendo aperfeiçoada a partir do desenvolvimento de pesquisas, sendo divulgada a versão ultrassonográfica (BI-RADS®US) em 2003 (AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY, 2003), e mais recentemente lançada sua nova edição em 2013 (AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY, 2013).

Tabela 2: Aspectos ultrassonográficos das lesões mamárias analisadas pelo sistema BI-RADS® de classificação (AMERICAN COLLEGE OF RADYOLOGY, 2013)

Composição tecidual	Homogênea gordurosa, homogênea fibroglandular, heterogêna	
Massas	Forma	oval, redonda, irregular
	Orientação	paralela, não paralela
	Margem	circunscrita, não circunscrita (indefinida, angulada, microlobulada, espiculada)
	Densidade	alta, similar, baixa, composição gordurosa
Calcificações	Tipicamente benignas	pele, vascular, aspecto “pipoca”, redonda, RIM, distrófica, calcificação láctea, sutura
	Morfologia suspeita	amorfa, heterogênea, pleomórfica, linear fina ou ramificação linear fina
	Distribuição	difusa, regional, agrupada, linear, segmentada
Distorção arquitetural	Presente, ausente	
Casos especiais	Assimetria	assimétrico, assimétrico global, assimétrico focal, assimetria em desenvolvimento
	Linfonodos intramamários	
	Lesões de pele	
	Ductos dilatados	
Características associadas	Retração tecidual, retração do mamilo, espessamento de pele, espessamento trabecular, adenopatia axilar, distorção arquitetural, calcificações	
Localização da lesão	Lateralmente, quadrante, profundal, distante do mamilo	

Tabela 3: Categorias de avaliação Léxico BI-RADS® e condutas terapêuticas sugeridas (AMERICAN COLLEGE OF RADYOLOGY, 2013).

Categorias	Comentário / Conduta Terapêutica	Probabilidade de Malignidade
0 - Incompleta	Necessária avaliação adicional	-
1 – Negativa	Nenhuma lesão observada / Rotina	0%
2 – Benigna	Achado sem características de malignidade / Rotina	0%
3 – Provavelmente benigna	Provavelmente benigno / Controle (6 meses)	0 a ≤ 2%
4 – Suspeita de malignidade	Considerar biópsia	
✓ 4A: Baixa	Baixa probabilidade de malignidade	2 a ≤ 10%
✓ 4B: Moderada	Moderada probabilidade de malignidade	10 a ≤ 50%
✓ 4C: Alta	Alta probabilidade de malignidade	50 a < 95%
5 - Altamente sugestiva de malignidade	Considerar biópsia / Conduta terapêutica adequada ao caso	≥ 95%
6 – Malignidade confirmada	Diagnóstico já obtido através de biópsia / Excisão cirúrgica quando apropriado	-

Através do sistema BI-RADS® são analisadas todas as alterações mamárias encontradas, levando-se em consideração desde aspectos relativos à composição tecidual da mama, até a presença de calcificações inter ou intra nodulares (CAMARGO JUNIOR, 2005; NASTRI et al., 2011). A partir desses achados o Léxico BI-RADS® distingue as lesões nodulares nas seguintes categorias: 0 – inconclusiva; 1- negativa; 2 – achados benignos; 3- achados provavelmente benignos; 4 – anormalidade suspeita; 5 – altamente sugestiva de malignidade; 6 – biópsia comprovada / malignidade reconhecida (LUNA, 2003).

Uma vez descrita a categorização da mama avaliada, é possível obter não só uma análise de importante fator prognóstico, como também uma melhoria na qualidade assistencial definida para cada caso. A implementação do Léxico BI-RADS® obteve tanta aceitação em seus padrões descritivos de nódulos mamários que tem sido replicado em outras áreas de análise imaginológica, como no monitoramento de lesões neoplásicas do fígado (LI-RADS), pulmão (LUNG-RADS) e próstata (PI-RADS) (RAO et al, 2016).

Na medicina veterinária a ultrassonografia mamária tem sido alvo de diversos estudos nas últimas décadas (BASTAN et al. 2009; FELICIANO et al. 2012b; SIMM, 2016), no entanto as informações relativas às diferenciações tumorais, assim como a padronização das mesmas, ainda são escassas na literatura. Recentemente a categorização

BI-RADS® teve sua replicação utilizada em mama de cadelas, pelo exame mamográfico (MOHAMMED et al., 2011) e ultrassonográfico (SOUZA, 2012), demonstrando nestes estudos, alta sensibilidade e especificidade na determinação de malignidade de neoformações.

Apesar da padronização permitida pela técnica, a ferramenta BI-RADS® não se apresenta isenta de subjetividade em sua avaliação de forma que novos métodos, visando análises quantitativas, tem sido propostos para auxiliar na redução da subjetividade e dependência do operador (AZEVEDO-MARQUES, 2001; CALAS et al., 2007).

2.4.2 HISTOGRAMA DOS NÍVEIS DE CINZA

A ultrassonografia convencional vem sendo utilizada para estudos diversos em pequenos animais, porém apresenta sua subjetividade de análise como principal desvantagem da técnica, uma vez que se trata de um método operador-dependente. A natureza dos tecidos avaliados é estimada pela ecogenicidade e ecotextura dos mesmos, podendo a impressão visual isoladamente ser insuficiente para uma análise precisa (MAEDA et al., 1998; FILHO et al, 2009).

Visando a redução das limitações da técnica, tem sido proposta a utilização de análise computacional quantitativa através do histograma dos níveis de cinza que analisa a distribuição dos *pixels* nos níveis de cinza contidos em uma região de interesse (ROI) da imagem (MAEDA et al, 1998). Vários aparelhos ultrassonográficos possuem esta ferramenta de avaliação disponível em seu *software*, no qual a intensidade do eco refletido pelo tecido avaliado será armazenado em cada *pixel* como um sinal digital. A partir de então o histograma constrói uma representação gráfica dos *pixels* obtidos, associado a cada nível de cinza presente na imagem, podendo também ser expressa em termos de percentual do número total de *pixels* (QUEIROZ, 2006; SILVA et al., 2015).

No gráfico, o eixo horizontal mostra os níveis de cinza em 255 medidas, ao passo que o eixo vertical abrange as porcentagens do número de *pixels* em cada escala de cinza. A largura de base do histograma é calculada automaticamente pelo *software* do aparelho ou manualmente através da fórmula: comprimento da largura de base / comprimento da escala de cinza cheia x 100% (MAEDA et al., 1998; FILHO et al., 2009). A ecotextura passa a ser analisada pela quantidade de pontos luminosos que mais se repetem na ROI, assim como pela diferença de amplitude dos ecos que retornam ao

aparelho, enquanto que a ecogenicidade é definida apenas pela quantidade de ecos que retornam ao transdutor (MAEDA et al., 1998; LEE et al., 2006). Uma vez definido os parâmetros de ecogenicidade e ecotextura, tais características representam importantes informações para conclusões diagnósticas, uma vez que quadros patológicos tendem a modificar as características teciduais, e conseqüentemente os aspectos ultrassonográficos (ALVARENGA et al., 2007).

Diversos estudos em humanos (LEE et al., 2006; AZEVEDO et al., 2009; ALVARENGA et al., 2012; MOON et al., 2015) e animais (SANTOS et al., 2013; SILVA et al., 2015; ZOTTI et al., 2015) analisaram as características de intensidade dos *pixels* das imagens ultrassonográficas, fornecendo informações quantitativas referentes à ecotextura e ecogenicidade do órgão. Na medicina humana a análise ultrassonográfica quantitativa é mais precisa para a caracterização das neoplasias mamárias quando comparada com o sistema BI-RADS[®], porém em cadelas estudos com esta técnica ainda estão restritos apenas à investigação de outros órgãos (MACHADO et al., 2009; SILVA et al., 2015).

2.4.3 ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER

A ultrassonografia convencional caracteriza-se como um exame amplamente utilizado na rotina de atendimento clínico de cadelas, no entanto, apresenta limitações de técnica para avaliação das características hemodinâmicas dos pacientes (SILVA et al., 2011). A ultrassonografia Doppler, por sua vez, é uma ferramenta recentemente introduzida na rotina veterinária, que permite a obtenção de informações em tempo real, sobre variados aspectos hemodinâmicos dos vasos, como a presença, a direção e o tipo de fluxo sanguíneo (CARVALHO et al., 2008; SILVA et al., 2011).

O efeito Doppler, citado pela primeira vez por Christian Johann Doppler em 1842, é descrito como o princípio físico no qual são observadas alterações da frequência das ondas sonoras refletidas, uma vez que o objeto refletor (hemácias) está em movimento em relação à fonte de onda sonora (transdutor) (KODAIRA, 2002; CARVALHO e ADDAD, 2004;). Apenas em meados de 1970 o fluxo vascular foi identificado e descrito pela primeira vez em animais, ficando a década marcada como o período de introdução desta ferramenta na medicina veterinária, e apresentando sua aplicação em exames de rotina dos animais domésticos (HELPER, 1970).

A ferramenta Doppler constitui-se de algumas técnicas que demonstram o deslocamento hemodinâmico de variados modos, entre elas o Doppler colorido e o Doppler pulsado. A primeira delas permite a visualização dos vasos, indicando presença ou ausência de fluxo, enquanto que o Doppler pulsado transmite as ondas sonoras em forma de impulso, produzindo um traçado espectral específico para cada vaso (CAVALHO et al., 2008). Nesta modalidade, o processamento da imagem Doppler pode ter seus recursos utilizados de forma simultânea e/ou complementar. Inicialmente, os vasos são localizados pelo do modo convencional, permitindo a avaliação de seus diâmetros e características de parede vascular. O Doppler colorido que possibilitará a partir de então a visualização do fluxo sanguíneo presente, é codificado em termos de uma ou duas cores e nuances dentro de uma área definida. A movimentação das hemácias dentro dos vasos é representada, na imagem, em função do sentido do seu movimento em relação ao transdutor (CARVALHO e ADDAD, 2004; CARVALHO et al., 2008), de maneira que terá uma cor para o fluxo que se aproxima do transdutor, e outra para aquele que se afasta do mesmo (BLAVIAS e BRANNAM, 2004; RUBENS et al., 2006; WOOD et al., 2010). Uma vez identificados, vasos e fluxos, inicia-se o modo Doppler pulsado ou espectral de um determinado segmento selecionado pelo volume de amostra (*gate*), onde as ondas sonoras são transmitidas na forma de impulso, formando uma representação gráfica característica de cada vaso sanguíneo (WOOD et al., 2010).

A ultrassonografia Doppler é comumente utilizada para avaliação das velocidades de fluxo dos vasos (HARRINGTON et al., 1995), que possibilitam, a partir desses dados, a obtenção de outras informações como os chamados índices Doppler, capazes de auxiliar a identificação de alterações vasculares diversas (CERRI et al., 1998; NYLAND e MATTOON, 2002). O Índice de Resistividade (RI) e Índice de Pulsatilidade (PI) são relações de velocidades obtidas pelo pulso da onda Doppler, a partir de mensurações indiretas da resistência vascular, através da relação entre a Velocidade de Pico Sistólico (PS) e a Velocidade Diastólica Final (ED), e a média das velocidades do espectro do fluxo vascular Doppler (NOVELLAS, 2007), podendo ser demonstrado nas equações:

$$RI = \frac{\text{Pico de velocidade sistólica} - \text{Velocidade diastólica final}}{\text{Pico de velocidade sistólica}}$$

$$PI = \frac{\text{Pico de velocidade sistólica} - \text{Velocidade diastólica final}}{\text{Velocidade média do ciclo}}$$

A perfusão sanguínea de processos tumorais também tem sido alvo de pesquisas através da ultrassonografia Doppler, correlacionando seus resultados a possíveis prognósticos de cada lesão (MARTINS et al., 2002; NASTRI et al., 2011; SOUZA, 2012).

A marcante formação de novos vasos observada nos processos tumorais sugeriu a implantação da Dopplerfluxometria no estudo do tumor de mama, uma vez que a mesma é capaz de detectar aumentos ou diminuições da resistência do fluxo vascular, permitindo a distinção entre lesões malignas e benignas (NYMAN et al., 2006b; FELICIANO et al., 2008; SOUZA, 2012). Esta informação baseia-se no reconhecido aumento de perfusão vascular identificado em tumores malignos, estando o mesmo diretamente relacionado a uma maior invasividade da lesão (PAULINELLI et al., 2003; NYMAN et al., 2006b). Na medicina humana o modo Doppler tem se caracterizado como ferramenta de avaliação da vascularização tumoral por meio de parâmetros como a velocidade máxima do fluxo na sístole e sua média, velocidade sistólica mínima, soma das velocidades máximas dos vasos e sua média, relação entre sístole e diástole máxima e mínima e sua média, médias das velocidades e determinação dos índices de resistência e de pulsatilidade. Esta análise tem demonstrado alta sensibilidade e especificidade na rotina de atendimento de mulheres com tumor de mama, alcançando percentuais aproximados de 95% e 97% respectivamente (MARTINS et al., 2002; NASTRI et al., 2011).

A avaliação Doppler além de dar indícios com relação a hemodinâmica de uma lesão tumoral, também fornece dados com relação à angiogênese, fator diretamente correlacionado ao crescimento e potencial invasivo de uma neoplasia (MOHAMMED et al., 2011).

2.5 ANGIOGÊNESE E FATORES DE CRESCIMENTO

A angiogênese se caracteriza como o processo de formação de novos vasos desempenhando importante papel no crescimento tumoral e desenvolvimento metastático (FOLKMAN, 1990; 1992; YONEMARU et al., 2006; ARGYLE e KHANNA, 2007). Os vasos neoformados tem sua origem a partir de vasos pré-existentes, no qual alguns estudos sugeriram inicialmente que este desenvolvimento se caracterizava apenas como uma reação ao processo inflamatório desencadeado pela lesão. Nas últimas décadas foram descobertas, no entanto, evidências divergentes às anteriormente descritas, indicando que a formação de novos vasos não se caracteriza como uma reação secundária ao tumor, mas

sim como condição essencial para que ele se desenvolva (FOLKMAN e KLAGSBRUN, 1987; PINHO, 2005).

Partindo da premissa que novos vasos sanguíneos são formados a partir de estruturas vasculares já existentes, sabe-se que este processo apresenta sua evolução influenciada por moduladores estimulantes ou inibidores da angiogênese (KATO et al., 2007; KUSEWITT e RUSH, 2007). Estes fatores são indispensáveis para o crescimento tumoral em virtude da nutrição e oxigenação possibilitada pelo fluxo vascular neoformado (COSTA, 2010). A base dos estudos citados, descreve que para que ocorra proliferações das células neoplásicas, e conseqüentemente o crescimento da massa tumoral, é necessário que haja anteriormente um aumento do número de capilares que suprem a neoplasia (FOLKMAN e KLAGSBRUN, 1987; PINHO, 2005).

Os fatores de crescimento produzidos pelas células tumorais foram descritos pela primeira vez na década de 1970 (FOLKMAN et al, 1970), sendo seu estudo dificultado inicialmente pela escassez de conhecimento acerca do processo de angiogênese. Era necessária a compreensão biológica do processo antes de um detalhamento sobre a sua análise bioquímica (FOLKMAN e KLAGSBRUN, 1987).

Os modulares de crescimento são, em sua maioria, polipeptídeos ou glicoproteínas que desempenham importante papel na regulação da proliferação das células, através de sua função mitogênica, além da proliferação e migração celular, e formação do endotélio vascular (CANTLEY et al, 1991; YONEMARU et al., 2006).

Uma vasta gama de fatores de crescimento já foram identificados como promotores ou inibidores da angiogênese (STOUFFER et al., 2001; RIBATTI et al., 2002), dentre os quais pode-se citar o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) e a Angiotensina II (ANG II) como estimuladores da formação de vasos sanguíneos (FELICIANO et al., 2012b).

2.5.1 FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)

O Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), também chamado de Fator de Permeabilidade Vascular (VPF) é considerado como um potente mitógeno de células endoteliais (FERRARA e DAVIS-SMYTH, 1997; CHARNOCK- JONES et al., 2004; KATO et al., 2007) e tem sido o fator pró-angiogênico mais estudado na oncologia humana (REBÊLO, 2009). No processo de neovascularização o VEGF apresenta ação mediada por seus receptores presentes nas células endoteliais, promovendo a proliferação

das mesmas através de mecanismos autócrinos e parácrinos (NOMURA et al., 1995; YONEMARU et al., 2006).

Em condições fisiológicas, as concentrações de VEGF regulam em valores basais, apresentando incremento da sua expressão em processos patológicos (CARMELIET e COLLEN, 2000). Os níveis séricos e plasmáticos de VEGF demonstram aumento em pacientes oncológicos humanos, caracterizando esta análise como importante indicador prognóstico de pacientes com câncer (WERTHER et al., 2002; LI et al., 2004). Assim como em humanos, em estudos recentes foi constatado que cães saudáveis demonstram níveis circulantes de VEGF inferiores aqueles pacientes que apresentam diagnóstico de neoplasia (GENTILINI et al., 2005; TROY et al., 2006), já tendo sido relatada sua superexpressão em tumor de células escamosas, tumores testiculares e mamários de cães (MAIOLINO et al., 2000; RESTUCCI et al., 2002; 2003; 2004).

Diante dos recentes estudos observa-se uma crescente vertente de pesquisas que buscam correlacionar a ocorrência de fatores de crescimento tumoral com o valor prognóstico de cada caso (PINHO, 2005; AMORIM, 2009), já havendo evidências de que altos níveis séricos de VEGF estão significativamente relacionados ao tamanho e diferenciação da lesão tumoral, grau de invasão e desenvolvimento vascular, e ocorrência de metástases à distância (PINHO, 2005). O aumento da expressão de VEGF tem sido correlacionado com o aumento do risco de metástase em variados tumores humanos, entre eles as neoformações do tecido mamário (SCHOEFFNER et al., 2005; PAVLAKIS et al., 2008).

Na medicina veterinária, no entanto, apenas estudos mais recentes tem se dedicado à avaliação do VEGF na rotina oncológica dos animais de companhia, havendo escassas informações referentes à relação entre a expressão gênica deste fator e características hemodinâmicas de cães. Em pesquisas desenvolvidas por Restucci et al. (2003; 2004) e Kato et al. (2007), sobre tumores mamários caninos, foi relatado não apenas um aumento da expressão gênica de VEGF e seus receptores nos pacientes com diagnóstico estabelecido, como também um evidente aumento para os casos de tumores com malignidade confirmada. Foi sugerido, portanto, a participação do VEGF e seus receptores na progressão tumoral e transformação maligna de tumores em cães, assim como já identificado em humanos (KATO et al., 2007).

2.5.2 ANGIOTENSINA (ANG II)

A angiotensina II (ANG II) é o peptídeo biologicamente ativo do sistema renina - angiotensina, constituindo um regulador importante da homeostase cardiovascular, além de ser reconhecido como um potente mitógeno (DESHAYES e NAHMIAS, 2005; FUJITA et al., 2005). A ANG II também apresenta atuação em variados processos patológicos, como remodelação tecidual, hipertrofias cardíacas, sendo também descrita como componente participativo da migração e proliferação celular, podendo estar envolvida em formações neoplásicas (NOUET e NAHMIAS, 2000). Pesquisas recentes apontam que a ANG II apresenta a capacidade de modificação da estrutura vascular e estimulação do processo de angiogênese, sendo seus componentes identificados em células tumorais de diversas neoplasias como as de pulmão, pâncreas, próstata, pele e mama (FUJITA et al., 2002; DESHAYES e NAHMIAS, 2005; OHNUMA et al., 2009).

Variados estudos sugerem que este peptídeo apresenta atuações estimulantes da carcinogênese e propõem a possibilidade de desenvolvimento de terapias anticancerígenas baseadas no uso de agentes inibidores da ANG II (DESHAYES e NAHMIAS, 2005). Em pacientes humanos o uso de inibidores da enzima conversora de ANG II, resultou em redução do risco de desenvolvimento tumoral (De GASPARO et al., 2000; TOUYZ e SCHIFFRIN, 2000), assim como em ratos que quando expostos à antagonistas dos receptores de ANG II, demonstraram não somente redução na expressão de VEGF, como também no desenvolvimento tumoral associado à angiogênese (FUJITA et al., 2005; OHNUMA et al., 2009).

As atividades desempenhadas pela ANG II são mediadas por dois receptores denominados ATR1 e ATR2 (CHIU et al., 1989). Na medicina humana, os efeitos moduladores de crescimento desses receptores foram relatados em células endoteliais coronárias e vasculares, onde o ATR1 demonstrou atividade celular proliferativa, ao passo que o ATR2 desempenhou ação contrária (STOLL et al, 1995; NAKAJIMA et al., 1995). Bloqueadores de ATR1 são utilizados no tratamento e controle de doenças cardiovasculares diversas (BELCHER et al., 1997), assim como apresenta sua atividade estabelecida na inibição da angiogênese e metástase de tumores em humanos, incluindo as neoplasias mamárias (FUJITA et al., 2002; DESHAYES e NAHMIAS, 2005; HERR et al. 2008; OHNUMA et al., 2009). Alguns estudos experimentais já sugeriram que o ATR2 apresenta atividade oposta a desempenhada pelo ATR1, de forma que o bloqueio

do subtipo 1 e a manutenção isolada da atividade do ATR2, afetaria beneficemente a terapia anticancerígena (DESHAYES e NAHMIAS, 2005).

Na medicina veterinária, no entanto, as informações acerca da atividade dos receptores de angiotensina ainda estão restritos a poucos estudos (MIYAJIMA et al, 2002), não havendo descrição na literatura sobre a associação dos mesmos com a ocorrência de tumores mamários de cadelas.

Geral

Analisar e categorizar por técnicas ultrassonográficas as neoplasias mamárias de cadelas e correlacionar com a expressão gênica do VEGF, FLT-1, FLK-1 e receptor de ANG II.

Específicos

- ✓ Analisar os achados ultrassonográficos tumorais de cadelas, de acordo com o sistema BI-RADS®;
- ✓ Analisar quantitativamente o aspecto ultrassonográfico dos níveis de cinza de neoplasias mamárias em cadelas pela técnica do histograma;
- ✓ Realizar Dopplervelocimetria do fluxo vascular de neoplasias mamárias em cadelas;
- ✓ Avaliar a expressão do VEGF e seus receptores (FLT-1 e FLK-1), e o receptor de ANG II (ATR1) em fragmentos de neoplasias mamárias de cadelas;
- ✓ Correlacionar as análises ultrassonográficas com a expressão do VEGF e seus receptores e o receptor de ANG II.

CAPÍTULO I

BI-RADS classification and gray level histogram of malignant mammary tumors in bitches¹

Débora M. Navarro^{2*}; Fabiano S. Costa²; Aurea Wischral²

ABSTRACT – NAVARRO D. M., COSTA F.S., WISCHRAL A. 2017. **BI-RADS classification and gray level histogram of malignant mammary tumors in bitches.** *Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00.* Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE, Brasil. E-mail: deboramnavarro@gmail.com Mammary tumor is the most frequent among the tumors that affect canine females, with relevant importance in veterinary medicine. The objective of this study was to determine the image characteristics of mammary tumors in female dogs, and compare different ultrasonographic techniques for neoplastic evaluation. They were used 30 bitches with histopathological diagnosis of malignant mammary tumor. Initially females were submitted to clinical and laboratory evaluation and then performed the ultrasound of abdomen and mammary tumor. The quantitative evaluation of gray levels of the histogram and tumor categorization by the modified BI-RADS were performed. The tumor mass were surgically resected, and tumor tissue samples were collected for histopathological analysis. Carcinoma in mixed tumor showed a higher rate (33.3%), and the malignancy degree of epidermal tumors were classified in grade 1 (n = 9), grade 2 (n = 12) and grade 3 (n = 3). Malignancy degree showed positive correlation with BI-RADS ($r = 0.55$; $P < 0.05$) and with the parameter echotexture - histogram base width ($r = 0.42$, $P < 0.05$). BI-RADS graduation also showed a positive correlation with the echotexture parameters (standard deviation of average echogenicity - $r = 0,66$, $P < 0,05$ and base width - $r = 0,55$, $P < 0,05$). It was concluded that the BI-RADS method in combination with the echotexture of tumors, can be used to evaluate mammary tumors in dogs and establish the planning of treatment.

INDEX TERMS: Ultrasound, Dogs, Neoplasm, Breast, Tumor Categories

1 Received on

Accepted for publication on

2 Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco,
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE,
Brasil. *Corresponding author: deboramnavarro@gmail.com

RESUMO – [Classificação BI-RADS e histograma dos níveis de cinza de tumores mamários malignos em cadelas]

Entre os tumores que acometem cadelas a neoplasia mamária é a de maior incidência, apresentando relevante importância na medicina veterinária. Este trabalho teve o objetivo de determinar as características imagiológicas de neoplasias mamárias em cadelas, e comparar diferentes técnicas ultrassonográficas de avaliação tumoral. Durante a realização deste experimento, foram utilizadas 30 cadelas, com diagnóstico histopatológico de neoplasia mamária. Inicialmente as fêmeas foram submetidas a avaliações clínicas e laboratoriais, e subsequentemente à realização dos exames ultrassonográficos de abdômen e da massa tumoral. Foram realizadas a análise quantitativa por histograma dos níveis de cinza e categorização tumoral pelo sistema BI-RADS. Posteriormente as cadelas foram submetidas à ressecção cirúrgica da massa tumoral, onde foram coletadas amostras do tecido neoplásico para análise histopatológica. O carcinoma em tumor misto foi o tipo tumoral de maior incidência (33.3%), e a graduação de malignidade dos tumores epiteliais foram classificadas em grau 1 (n = 9), grau 2 (n = 12) e grau 3 (n = 3). A graduação demonstrou correlação positiva com a categorização BI-RADS ($r = 0.55$; $P < 0.05$) e com o parâmetro de ecotextura – largura de base do histograma ($r = 0.42$, $P < 0.05$). A graduação BI-RADS também demonstrou uma correlação positiva com os parâmetros de ecotextura (desvio padrão da média da ecogenicidade - $r = 0,66$, $P < 0,05$ e largura de base - $r = 0,55$, $P < 0,05$). Conclui - se que o método de categorização BI-RADS, assim como os parâmetros de ecotextura dos tumores, podem ser usados para avaliação de neoplasia mamária em cadelas e assim auxiliar no planejamento de tratamento de cada caso.

INTRODUÇÃO

A neoplasia mamária de cadelas é considerada a mais frequente entre os processos neoplásicos que acometem fêmeas caninas, tendo seu estudo apresentado destacada importância em decorrência da similaridade existente com variadas características do tumor de mama de mulheres (Mohammed et al. 2011, Shafiee et al. 2013, Cassali et al. 2014).

Na medicina humana a ultrassonografia mamária constitui uma importante ferramenta para detecção e monitoramento de nódulos em pacientes com exame mamográfico inconclusivo (Kuhl et al. 2005). Entre os métodos diagnósticos disponíveis para avaliação mamária em pequenos animais, a ultrassonografia assume papel de destaque nas análises teciduais e distinção dos tumores benignos e malignos, favorecendo assim a adoção da melhor conduta terapêutica para cada paciente (Nyman et al. 2006, Mohammed et al. 2011). Esta técnica possibilita a obtenção de informações sobre o parênquima mamário, como características relacionadas ao tamanho da massa, bordos, arquitetura interna e adjacente, ecogenicidade e ecotextura (Bastan et al. 2009).

Por se tratar de um exame operador dependente e da falta de critérios pré-estabelecidos, o Colégio Americano de Radiologia (ACR) desenvolveu um sistema de classificação e padronização dos laudos, denominado BI-RADS® (Breast Imaging and Reporting Data System) (American College of Radiology 1993), que possibilita uma avaliação quanto à evolução diagnóstica de nódulos mamários, e conseqüentemente uma recomendação da conduta clínico/cirúrgica, baseada na morfologia dos achados ecográficos (Calas et al. 2007). O BI-RADS®, utilizado inicialmente apenas para avaliações mamográficas de mulheres, passou por atualizações nos últimos anos, sendo adaptado à ultrassonografia em 2003 (American College of Radiology 2003), e recentemente foi adaptado para uso em cadelas (Mohammed et al. 2011).

O exame ultrassonográfico mamário de cadelas tem sido alvo de diversos estudos nas últimas décadas (Bastan et al. 2009; Feliciano et al. 2012), no entanto as informações relativas às diferenciações tumorais, assim como a padronização das

mesmas, ainda são bastante escassas na literatura, o que culmina na obtenção de laudos, por vezes, inconclusivos.

Apesar da padronização permitida pela técnica, a ferramenta BI-RADS® não se apresenta isenta de subjetividade em sua avaliação de forma que novos métodos, visando análises quantitativas, tem sido propostos para auxiliar na redução da subjetividade e dependência do operador (Calas et al. 2007). Diversos estudos em humanos (Lee et al. 2006, Alvarenga et al. 2012, Moon et al. 2015) e animais (Silva et al. 2015; Zotti et al. 2015) analisam as características de intensidade dos pixels das imagens ultrassonográficas, fornecendo informações quantitativas referentes à ecotextura e ecogenicidade do órgão. Na medicina humana a análise ultrassonográfica quantitativa é mais precisa para a caracterização das neoplasias mamárias quando comparada com o sistema BI-RADS®, porém em cadelas estudos com esta técnica são restritos à investigação de outros órgãos (Ivancic e Mai 2008, Silva et al. 2015).

A elaboração e estabelecimento destes parâmetros podem representar fundamental importância para a melhoria da qualidade assistencial dedicada aos tratamentos oncológicos de cães, favorecendo desta forma a sobrevivência destes pacientes. Face ao exposto e tendo a análise histopatológica como padrão ouro para a tipificação do processo neoplásico, objetivou-se neste estudo analisar o aspecto ultrassonográfico de neoplasias mamárias em cadelas pelo sistema BI-RADS e análise de histograma, visando aumentar a precisão na diferenciação ultrassonográfica das massas neoplásicas e melhor orientação da conduta terapêutica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas para a seleção do grupo amostral 30 cadelas provenientes da rotina hospitalar, sendo estas sem distinção de idade ou raça. Para cada cadela avaliada, foi realizada uma ficha de identificação com os dados relacionados ao histórico reprodutivo das mesmas, contendo também informações relativas à localização anatômica e tempo de evolução dos nódulos mamários, além de principais características das massas tumorais. Durante avaliação macroscópica verificou-se a consistência, dimensões e grau de aderência das lesões em tecidos adjacentes, assim como a presença ou ausência de áreas ulcerativas. Nas cadelas que

apresentavam mais de uma nodulação nas glândulas mamárias, optou-se pela análise da maior massa identificada.

Todas as avaliações ultrassonográficas foram realizadas em um equipamento de ultrassom, com transdutor microconvexo multifrequencial de banda variável de 6 a 8 MHz, e sendo estabelecido o uso da maior frequência para análise das lesões tumorais. Não foi realizada contenção química para realização dos exames, de maneira que as cadelas foram contidas manualmente em decúbito lateral direito e/ou esquerdo.

No que diz respeito à classificação BI-RADS proposta, esta se baseou em características ultrassonográficas de forma, orientação, margem, padrões de eco da massa, e achados associados, assim como critérios relativos à presença de calcificações e vascularização interna e/ou periférica (Figura 1).

Figura 1: Imagens ultrassonográficas de tumores mamários caninos com variadas características imagiológicas. A) Massa ecogênica de ecotextura heterogênea; B) Massa de aspecto cavitário, apresentando ecogenicidade mista e ecotextura heterogênea; B) Ultrassonografia Doppler de nódulo mamário com presença de intensa vascularização interna e periférica.



A partir desta análise, as lesões foram classificadas de acordo com o sistema léxico BI-RADS modificado, desenvolvido a partir da classificação proposta pelo Colégio Americano de Radiologia (2013) que padroniza 6 (seis) categorias com suas respectivas sugestões de conduta terapêutica (Tabela 1).

Tabela 1: Léxico BI-RADS modificado de classificação ultrassonográfica de tumores mamários caninos, com respectivas condutas terapêuticas sugeridas e percentual de malignidade esperado.

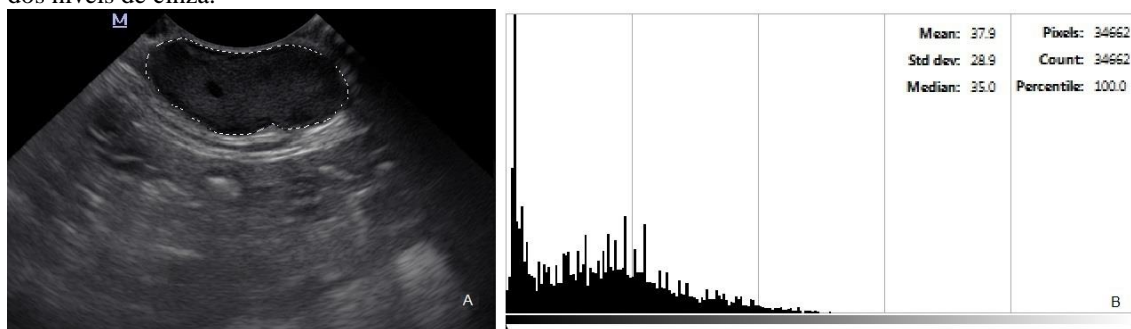
Categorias	Comentário / Conduta	Probabilidade de Malignidade
1. Negativa	Nenhuma lesão observada / Rotina	0%
2. Benigna	Achado sem características de malignidade / Rotina	0%
3. Provavelmente benigna	Provavelmente benigno / Controle (6 meses)	0 a ≤ 2%
4. Suspeita de malignidade	Considerar biópsia	

4 A: Baixa	Baixa probabilidade de malignidade	2 a \leq 10%
4 B: Moderada	Moderada probabilidade de malignidade	10 a \leq 50%
4 C: Alta	Alta probabilidade de malignidade	50 a $<$ 95%
5. Altamente sugestiva de malignidade	Considerar biópsia / Conduta terapêutica adequada ao caso	\geq 95%
6. Malignidade confirmada	Diagnóstico já obtido através de biópsia / Excisão cirúrgica quando apropriado	

Neste estudo o sistema léxico foi modificado, pois não incluiu em sua avaliação a categoria zero presente no léxico BI-RADS®, pois a mesma é caracterizada por uma avaliação mamográfica incompleta que necessita de incidências ou técnicas adicionais, exame este ainda pouco acessível na rotina de atendimento veterinário.

Para a análise quantitativa das lesões foi utilizada a técnica de histograma dos níveis de cinza, baseado no método descrito por Maeda et al. (1998). Selecionouse uma imagem ultrassonográfica em corte longitudinal/transversal que melhor representasse as características tumorais de cada amostra, sendo posteriormente analisada em programa computacional (GIMP® 2.8.14). A massa tumoral foi delimitada manualmente, sendo obtidos valores referentes à ecogenicidade e ecotextura (Figura 2). A ecogenicidade foi caracterizada pela média de intensidade de pixels dos picos observados em cada amostra (ecogenicidade média). Para análise da ecotextura foram utilizados o desvio padrão da média da ecogenicidade da região selecionada e a largura de base do histograma de cada amostra, sendo esta largura determinada pelo percentual da base do gráfico, ocupada por picos de pixels.

Figura 2: A) Imagem ultrassonográfica com seleção de área de interesse correspondente à neoplasia mamária; B) Avaliação quantitativa da ecogenicidade e ecotextura tumoral mamária através de histograma dos níveis de cinza.



Após realização dos exames imaginológicos, as cadelas foram submetidas à ressecção cirúrgica da massa, com posterior obtenção das medidas tumorais e coleta do fragmento para análise histopatológica. Visando uma categorização que possibilitasse diferenciar histologicamente as amostras analisadas, foi realizada também a graduação de malignidade segundo Elston e Ellis (1991), que restringe tal graduação histológica para carcinomas invasivos, não abrangendo os tumores de origem mesenquimal. As amostras foram fixadas em formaldeído 10% (v/v) preparado em PBS 0,01M e pH 7,2. Os fragmentos foram submetidos à clivagem, sendo em seguida processados de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em blocos de parafina, cortados em micrótomo rotativo 4 micrômetros e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (HE). O diagnóstico histopatológico assim como a graduação de malignidade das massas, basearam-se na classificação proposta por Cassali et al. (2014). Nos casos em que não houve a confirmação histopatológica de neoplasia mamária, foi determinada a exclusão do animal do grupo amostral.

Os dados foram analisados usando testes estatísticos descritivos como média e desvio padrão. Para análise de correlação foi utilizado o teste de Spearman (dados não paramétricos) ou de Pearson (dados paramétricos). Quando necessário, os valores originais foram transformados em logaritmo. Foi considerado significativo quando o valor de $P < 0,05$.

Este projeto foi encaminhado para a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, apresentando licença de número 0095/2015.

RESULTADOS

As 30 cadelas integrantes deste experimento apresentaram uma idade média de $10,7 \pm 2,6$ anos, das quais apenas 6 (seis) fêmeas apresentaram um histórico prévio de castração. Ao exame clínico foram observadas massas tumorais com tamanho médio de $6,8 \pm 3,2$ cm, 10% das quais apresentavam-se ulceradas.

Quanto à avaliação histopatológica, todas foram classificadas como malignas, onde 80% dos casos corresponderam a neoplasias de origem epitelial, sendo as massas de origem mesenquimal menos frequentes (20%). O tumor com maior prevalência foi o carcinoma em tumor misto, correspondendo à 33,3% dos casos e em seguida o

carcinoma tubular com 20% de ocorrência. Outros tipos tumorais foram diagnosticados em menor frequência (Tabela 2).

Tabela 2: Descrição histopatológica dos tumores mamários caninos e suas respectivas frequências.

Tipo tumoral	Número de amostras / (%)
Carcinoma em tumor misto	10 (33,3)
Carcinoma tubular	6 (20)
Carcinoma in situ	2 (6,6)
Carcinoma sólido	2 (6,6)
Sarcoma em tumor misto	2 (6,6)
Adenomioepitelioma maligno	1 (3,3)
Carcinoma anaplásico	1 (3,3)
Carcinoma mucinoso	1 (3,3)
Carcinoma papilar	1 (3,3)
Carcinoma rico em lipídeos	1 (3,3)
Fibrossarcoma	1 (3,3)
Hemangiossarcoma	1 (3,3)
Lipossarcoma	1 (3,3)

A análise pela técnica de categorização BI-RADS realizada previamente à remoção cirúrgica das massas neoplásicas, demonstrou variação de graduação entre 3 e 5, sendo quatro amostras classificadas como 3, duas 4A, sete 4C e dezessete como 5. A tabela 3 mostra a distribuição das frequências de BI-RADS de acordo com a classe tumoral.

Tabela 3: Frequência (%) de categorização BI-RADS de acordo com a classe tumoral

Tumores mamários	BI-RADS (%)					
	1	2	3	A	B	C
epiteliais (n = 24)	0	0	3 (12,5)	2 (8,3)	0	6 (25,0)
mesenquimais (n = 6)	0	0	1 (16,7)	0	0	1 (16,7)

Quanto ao grau de malignidade, nove das 24 amostras obtidas foram classificadas em Grau 1, doze em Grau 2 e três em Grau 3. Quando se avaliou a

relação entre a graduação de malignidade pelo método histológico e a classificação BI-RADS observou-se correlação positiva entre as variáveis ($r = 0,55$; $P < 0,05$).

A análise quantitativa das imagens ultrassonográficas resultou em dados referentes às medidas de tendência central da ecotextura e ecogenicidade das regiões de interesse selecionadas. Os valores da ecogenicidade média, do desvio padrão da ecogenicidade média e a largura da base do histograma (%) para os tumores epiteliais foram de $42,29 \pm 10,83$, $21,50 \pm 7,84$ e $54,92 \pm 16,70$, respectivamente; enquanto que nos tumores de origem mesenquimal os valores foram de $46,85 \pm 14,97$, $21,23 \pm 8,07$ e $56,99 \pm 15,61$, respectivamente (Tabelas 4 e 5).

Observou-se correlação positiva e significativa entre as análises ultrassonográficas pelo método BI-RADS e análises quantitativas pela técnica do histograma, verificando-se que quanto maior a graduação na escala BI-RADS mais ecogênica e heterogênea era seu aspecto. Uma correlação positiva foi verificada entre as medidas de ecotextura (desvio da ecogenicidade média - $r = 0,66$, $P < 0,05$ e largura de base - $r = 0,55$, $P < 0,05$) e a escala BI-RADS.

Quanto à graduação histológica do grau de malignidade, a ecogenicidade, inferida a partir dos valores de intensidade de pixels da imagem não apresentou correlação significativa ($r = 0,27$, $P > 0,05$), no entanto, observou-se correlação positiva entre ao grau de malignidade e a escala BI-RADS ($r = 0,55$, $P < 0,05$) e a largura de base do histograma ($r = 0,42$, $P < 0,05$). As médias das medidas ultrassonográficas de acordo com o grau de malignidade são apresentadas nas tabelas 4 e 5. Não foi observada correlação significativa entre os tipos tumorais histológicos e os parâmetros ultrassonográficos.

Tabela 4: Grau de malignidade, BI-RADS, média e desvio padrão das análises do histograma em tumores mamários de origem epitelial em cadelas.

Amostra	Histopatológico	Malignidade	BI-RADS	Histograma		
				EM	DP	LB (%)
1	Carcinoma em tumor misto	III	5	37,6	28,4	51,37
2	Carcinoma anaplásico	II	5	45,7	18,1	54,90
3	Carcinoma rico em lipídeos	I	3	35,2	13,1	34,90

4	Carcinoma tubular	II	4C	41,5	18,7	47,84
5	Carcinoma mucinoso	III	5	50,5	21,5	56,07
6	Carcinoma <i>in situ</i>	II	5	34,0	14,5	38,60
7	Carcinoma em tumor misto	II	4C	35,0	17,2	41,17
8	Carcinoma tubular	I	4C	56,4	19,8	55,68
9	Carcinoma sólido	II	5	60,9	21,0	59,60
10	Carcinoma em tumor misto	I	4C	27,4	13,3	36,86
11	Carcinoma <i>in situ</i>	II	4C	42,7	25,3	62,35
12	Carcinoma em tumor misto	I	4A	36,2	12,4	34,50
13	Carcinoma papilar	II	5	55,3	34,8	82,74
14	Carcinoma tubular	II	5	40,7	28,4	77,64
15	Carcinoma em tumor misto	II	5	45,3	43,2	81,17
16	Carcinoma em tumor misto	II	5	40,8	17,4	43,52
17	Carcinoma em tumor misto	II	5	47,3	26,4	53,72
18	Carcinoma tubular	I	4C	56,8	22,2	64,7
19	Carcinoma tubular	II	3	23,0	15,8	53,72
20	Carcinoma tubular	III	5	60,7	29,8	89,41
21	Carcinoma sólido	I	4A	27,2	12,5	31,76
22	Carcinoma em tumor misto	I	5	28,2	16,3	49,01
23	Carcinoma em tumor misto	I	5	48,8	29,6	76,86
24	Carcinoma em tumor misto	I	3	37,7	16,2	40,00
	Média ± dp	-	-	42,29 ± 10,8	21,50 ± 7,8	54,92 ± 16,7

EM = Ecogenicidade média; DP = desvio padrão da ecogenicidade; LB = largura de base

Tabela 5: Grau de malignidade, BI-RADS e média e desvio padrão das análises do histograma em tumores mamários de origem mesenquimal em cadelas.

Amostra	Histopatológico	BI-RADS	Histograma		
			EM	DP	LB (%)
1	Sarcoma em tumor misto	5	55,9	35,1	75,29
2	Fibrossarcoma	5	54,0	18,9	49,01
3	Sarcoma em tumor misto	4C	33,2	12,1	36,86
4	Hemangiossarcoma	5	60,5	24,8	72,15
5	Lipossarcoma	5	54,3	20,9	45,09
6	Adenomioepitelioma maligno	3	23,2	15,6	63,52
	Média ± dp	-	46,85 ± 14,9	21,23 ± 8,07	56,99 ± 15,61

EM = Ecogenicidade média; DP = desvio padrão da ecogenicidade; LB = largura de base

DISCUSSÃO

Este estudo avaliou cadelas portadoras de tumor mamário com faixa etária que coincide com estudos que comprovaram que cadelas com idade superior a 10 anos, não castradas, apresentam maior incidência de tumores de mama, decorrente da maior exposição do parênquima glandular a fatores hormonais que predispõem ao desenvolvimento neoplásico (Mohammed et al. 2011, Cassali et al. 2014). Foi observado ainda nódulos com tamanho médio superior a cinco centímetros, característica considerada como fator prognóstico para avaliação de tumores mamários caninos, indicando que massas acima de três centímetros estão significativamente correlacionadas com prognósticos ruins (Cassali et al. 2014).

No que diz respeito a frequência dos tipos tumorais observados, o carcinoma em tumor misto apresentou maior incidência entre os casos (33,3%), corroborando com estudos anteriores que demonstraram maior prevalência dos tumores de origem epitelial entre as neoplasias mamárias de cadelas (Cassali et al. 2012, Tavasoly et al. 2013).

A classificação BI-RADS de tumores mamários apresenta sua utilização consolidada na medicina humana, no entanto sua aplicação na veterinária ainda se restringe a pesquisa realizada por Mohammed et al. (2011) utilizando os critérios

estabelecidos na quarta edição publicada em 2003 (American College of Radiology 2003), e do qual nenhum estudo foi encontrado utilizando as informações da quinta e última edição, publicada em 2013 (American College of Radiology 2013). Para a aplicação da técnica na espécie canina, foi realizado ajuste do sistema léxico BI-RADS® para melhor adequação às ferramentas diagnósticas disponíveis na medicina veterinária. Foi realizada a exclusão da categoria zero, visto que a mesma abrange avaliações mamárias realizadas através de mamografia, exame este ainda pouco acessível na rotina de atendimento veterinário.

A aplicação do sistema BI-RADS pode desempenhar importante função na rotina clínico-oncológica de pequenos animais (Mohammed et al. 2011), fato também verificado a partir da correlação significativa encontrada nesse estudo entre a classificação BI-RADS proposta e o grau de malignidade, demonstrando a eficácia desta técnica. Assim como em humanos (Nascimento et al. 2009) esta classificação pode servir como base para orientação futura de planejamento de procedimentos invasivos e/ou cirúrgicos necessários para identificação de tipos tumorais, minimizando procedimentos agressivos em pacientes sem indicação para tal, assim como a adoção de medidas conservativas quando possível. Este auxílio ao direcionamento da conduta terapêutica pode ser mais eficaz somando-se ao BI-RADS a análise quantitativa das lesões, que toma como base aspectos relacionados à ecogenicidade e ecotextura das massas tumorais (Martin et al. 2006, Shen et al. 2007).

O grau de heterogenicidade das neoplasias mamárias, determinado a partir do histograma dos níveis de cinza, demonstrou correlação positiva quando confrontado com a classificação BI-RADS e a graduação de malignidade histopatológica das amostras. Fatores relacionados à necrose tecidual com seus subsequentes agrupamentos de calcificações, frequentemente observados em neoplasias malignas (Cheville 2004, Martins et al. 2010) promovem intensas alterações nas características teciduais promovendo diferentes graus de reflexão das ondas sonoras com consequente aumento da heterogenicidade da massa neoplásica (Lima et al. 2013). Nas neoplasias mamárias, um maior grau de malignidade está relacionado a um maior índice mitótico e rápido crescimento tecidual, fato que pode promover isquemia e necrose (Jones et al. 1997, Cheville 2001).

Alguns tipos de tumores mamários malignos, especialmente os carcinomas mistos, podem desenvolver ilhas de cartilagem e/ou áreas mineralizadas (Jones et al. 1997), que na ultrassonografia serão observadas como áreas hiperecogênicas com formação de sombra acústica distal (Lima et al. 2013). Entretanto, a presença de calcificações pode ocorrer em processos benignos, uma vez que esta pode ser uma resposta do organismo à processos prévios de cicatrização e necrose (Martins et al. 2010). Outro fator que tem sido associado a neoplasias mamárias de origem epitelial é a hipercalcemia da malignidade, onde se verifica, pelas células neoplásicas, uma hipersecreção ectópica de peptídeos que mimetizam a atividade do paratormônio. Nesses casos ocorre desencadeamento de sinais clínicos semelhantes ao hiperparatireoidismo, aumentando a possibilidade de calcificação de tecidos moles à distância (Cheville 2001).

Algumas neoplasias malignas da glândula mamária produzem lesões cavitárias com conteúdo líquido, tais como o carcinoma papilar e carcinoma tubular (Jones et al., 1997). Ao exame ultrassonográfico estas lesões influenciam a heterogenicidade tecidual e se caracterizam por área anecóica com formação de reforço acústico distal (Lima et al. 2013). Entretanto, este achado não deve ser utilizado como critério único para a sugestão de grau de malignidade neoplásica, pois como descrito por Oliveira Filho et al. (2010) estas lesões podem também ser observadas em distúrbios do crescimento da glândula mamária, caracterizados como simples processos benignos. Fatores como característica do tecido adjacente, vascularização e dimensões da massa devem ser analisadas conjuntamente para sugestão diagnóstica (Cassali et al. 2014).

Sobre a ecogenicidade das neoplasias estudadas, não foi verificada correlação positiva com a categorização BI-RADS, assim como com o grau de malignidade, sendo caracterizados diferentes graus de ecogenicidade nas neoplasias malignas. Os tumores mamários malignos se apresentaram com variáveis graus de ecogenicidade a depender da severidade de alterações no tecido neoplásico, tais como calcificação, necrose e diferenciação celular.

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos conclui-se que o método BI-RADS está relacionado com o grau de malignidade das lesões neoplásicas sugerindo a

viabilidade de aplicação clínica da técnica em cadelas, devendo seu uso ser estimulado para um melhor planejamento do tratamento cirúrgico e/ou quimioterápico dessa espécie.

Na avaliação ultrassonográfica das neoplasias pela técnica do histograma dos níveis de cinza, a ecotextura se caracterizou como um fator prognóstico mais significativo que a ecogenicidade, uma vez que quanto mais heterogênea a massa neoplásica, maior o grau de malignidade observado.

Agradecimentos – À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de doutorado.

REFERENCES

- Alvarenga A.V., Infantosi A.F.C., Wagner C.A., Pereira W.C.A. & Azevedo C.M. 2012. Assessing the combined performance of texture and morphological parameters in distinguishing breast tumors in ultrasound images. *Med. Phys.* 39(12): 7350-7358. doi: 10.1118/1.4766268.
- American College of Radiology. 1993. Breast imaging reporting and data system (BI-RADS) 1st ed. Reston, VA: American College of Radiology.
- American College of Radiology. 2003. Breast Imaging Reporting and Data System Ultrasound (BIRADS™-Ultrasound). Reston, VA: American College of Radiology.
- American College of Radiology. 2013 Breast imaging reporting and data system (BI-RADS) 5th ed. Reston, VA: American College of Radiology.
- Bastan A., Özenç E. & Pir Yagci I. 2009. Ultrasonographic evaluation of mammary tumors in bitches. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 1(15): 81-86.
- Calas M.J.G., Koch H.A. & Dutra, M.V.P. 2007. Breast Ultrasound: evaluation of echographic criteria for differentiation of breast lesions. *Radiol. Bras.* 40:1-7.
- Cassali G.D., BERTAGNOLLI A.C., FERREIRA E., DAMASCENO K.A., GAMBA C.O. & CAMPOS C. B. 2012 Canine Mammary Mixed Tumours: A Review. *Vet. Med. Int.* 2012: 1-7.
- Cassali G.D., Lavalle G.E., Ferreira E., Estrela-Lima A., De Nardi A.B., Ghevers 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. 2014. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. *Braz. J. Vet. Pathol.* 7(2): 38-69.
- Cheville N.F. 2001. *Introduction to Veterinary Pathology*, 2nd ed, CDROM, Wiley-Blackwell, New York, USA.
- Elston C.W. & Ellis I.O. 1991 Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 19(5): 403-410.
- Feliciano M.A.R., Vicente W.R.R. & Silva M.A.M. 2012 Conventional and Doppler ultrasound for the differentiation of benign and malignant canine mammary tumours. *J. Small Anim. Pract.* 53(6): 332-337.
- Ivancic M. & Mai W. 2008. Qualitative and quantitative comparison of renal vs. hepatic ultrasonographic intensity in healthy dogs. *Vet. Radiol. Ultrasoun.* 49(4): 368-373.
- Jones T.C., Hunt R.D. & King N.W. 1997. *Veterinary Pathology*, 6th ed, Blackwell, New York, USA.
- Kuhl C.K., Schrading S., Leutner C.C., Morakkabati-Spitz N., Waldermann E., Fimmers R., Kuhn W. & Schild H.H. 2005. Mammography, Breast Ultrasound, and Magnetic Resonance Imaging for Surveillance of Women at High Familial Risk for Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 23(33): 8469-8476.
- Lee H.C., Choi J.W., Kim K.A., Seo T.S., Lee J.M. & Park C.M. 2006 Usefulness of standard deviation on the histogram of ultrasound as a quantitative value for hepatic parenchymal echo texture: preliminary study. *Ultrasound Med. Biol.* 32:1817-1826.
- Lima J.L.S., André A. & Santos A.C. 2013. Reproduction and study of artifacts in ultrasound. *Rev. Bras. Fis. Med.* 7(3): 205-208.
- Maeda K., Utsu M. & Kihale P.E. 1998. Quantification of sonographic echogenicity with grey-level histogram width: A clinical tissue characterization. *Ultrasound Med. Biol.* 24(2): 225-234.

- Martin K.E., Helvie M.A., Zhou C., Roubidoux M.A., Bailey J.E., Paramagul C., Blane C.E., Klein K.A., Sonnad S.S. & Chan H. 2006. Mammographic Density Measured with Quantitative Computer-aided Method: Comparison with Radiologists' Estimates and BI-RADS Categories. *Radiology*. 240(3): 656-665.
- Martins L.A.L., Barra A.A. & Lucena C.E.M. 2010. Breast microcalcifications suspected of malignancy. *Rev. Bras. Cancerol.* 56(2): 251-258.
- Mohammed S.I., Meloni G.B., Parpaglia M.L., Marras V., Burrai G.P., Meloni F., Pirino S. & Antuofermo E. 2011. Mammography in ultrasound imaging of preinvasive and invasive canine spontaneous mammary cancer and their similarities to human breast cancer. *Cancer Prev. Res.* 4(11): 1790-1798.
- Moon W.K., Huang Y., Lo C., Huang C., Bae M.S., Kim W.H., Chen J. & Chang R. 2015. Computer-aided diagnosis for distinguishing between triple-negative breast cancer and fibroadenomas based on ultrasound texture features. *Med. Phys.* 42: 3024-3035. doi: 10.1118/1.4921123.
- Nascimento J.H.R., Silva V.D. & Maciel A.C. 2009. Accuracy of sonographic findings in breast cancer: correlation between BI-RADS categories and histological findings. *Radiol. Bras.* 42(4): 235-240. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-39842009000400009>
- Nyman H.T., Nielsen O.L. & Mcevoy F.J. 2006. Characterization of canine superficial tumors using gray-scale B-mode, color flow mapping, and spectral Doppler ultrasonography-a multivariate study. *Vet. Radiol. Ultrasound.* 47(2): 192-198.
- Oliveira Filho J.C. 2010. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesq. Vet. Bras.* 30(2): 177-185.
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2010000200014&lng=en&nrm=iso>. Accessed 15 Oct 2016.
- Shafiee R., Javanbakht J., Atyabi N., Kheradmand P., Kheradmand D., Bahrami A., Daraei H. & Khadivar F. 2013. Diagnosis, Classification, and grading of canine mammary tumors as a model to study human breast cancer: an clinical-cytopathological study environmental factors influencing public health and medicine. *Cancer Cell Int.* 13(79): 79. doi: 10.1186/1475-2867-13-79.
- Shen W., Chang R., Moon W., Chou Y. & Huang C. 2007. Breast Ultrasound Computer-Aided Diagnosis Using BI-RADS Features. *Acad. Radiol.* 14(8): 928-939.

- Silva E.G., Gonçalves M.T.C., Pinto S.C.C., Soares D.M., Oliveira R.A., Alves F.R., Araújo A.V.C. & Guerra P.C. 2015. Quantitative analysis of testicular echogenicity by technical histogram in sheep of the western lowland region of Maranhão, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 35(3): 297-303. doi: 10.1590/S0100-736X2015000300014.
- Tavasoly A., Golshahi H., Rezaie A. & Farhadi M. 2013. Classification and grading of canine malignant mammary tumors. *Vet. Res. Forum.* 4(1): 25-30.
- Zotti A., Banzato T., Gelain M.E., Centellegue C., Vaccaro C. & Aresu L. 2015. Correlation of renal histopathology with renal echogenicity in dogs and cats: an ex-vivo quantitative study. *BMC. Vet. Res.* 11(99). doi: 10.1186/s12917-015-0415-8.

CAPÍTULO II

ANÁLISE DOPPLERFLUXOMÉTRICA E ANGIOGÊNICA DE TUMORES MAMÁRIOS CANINOS

Dopplerfluxometric and angiogenic analysis of canine mammary tumors

NAVARRO, D. M.^I; SILVA, D. M. F.^{II}; COSTA, F. S.^{III}; WISCHRAL, A.^{III}

^I Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical – UFRPE, PE

^{II} Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária – UFRPE, PE

^{III} Professor(a) do Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE, PE

RESUMO

Foi avaliado o comportamento da perfusão tumoral, visando melhorar a caracterização das massas neoplásicas. Foram utilizadas 27 cadelas, com diagnóstico histopatológico de neoplasia mamária, sendo submetidas a avaliação Dopplerfluxométrica tumoral, e coleta de fragmentos neoplásicos para análise de expressão gênica de VEGF, FLT-1, FLK-1 e ATR1. Foi observada correlação positiva entre o FLT-1 e as variáveis PS, PI e RI. O FLK-1 apresentou correlação igualmente positiva com os parâmetros PS e PI, e uma tendência para RI ($r = 0.45$, $P = 0.07$), enquanto que o VEGF apresentou correlação positiva apenas com PI. O VEGF também apresentou correlação positiva com seus receptores, porém não apresentou correlação com o ATR1. O FLT-1 e FLK-1 apresentaram ainda correlação positiva entre si, e com o ATR1. Houve diferença significativa entre os tipos tumorais quanto à expressão média do VEGF sendo maior entre os tumores epiteliais do que nos mesenquimais. As variáveis PS, PI e RI, associados com a expressão do VEGF e seus receptores, mostraram-se relevantes para caracterizar a neovascularização de tumores malignos, e a maior expressão do VEGF em tumores mamários epiteliais do que mesenquimais pode ser um indicador auxiliar na caracterização de neoplasias mamárias malignas em cadelas.

Palavras-chave: Neoplasia, cães, Doppler, ATR1, VEGF

ABSTRACT

The behavior of the tumor perfusion was evaluated aiming to improve the characterization of the neoplastic masses. Twenty-seven bitches with histopathological diagnosis of mammary neoplasia were submitted, and submitted to tumor Dopplerfluxometric

evaluation and collection of neoplastic fragments to analyze the gene expression of VEGF, FLT-1, FLK-1 and ATR1. Positive correlation was observed between FLT-1 and PS, PI and RI. FLK-1 presented a similar positive correlation with the PS and PI parameters, and a tendency for IR ($r = 0.45$, $P = 0.07$), whereas VEGF showed a positive correlation just with PI. VEGF also showed a positive correlation with its receptors, but did not present a correlation with ATR1. FLT-1 and FLK-1 also showed positive correlation with each other, and with ATR1. There was a significant difference between tumor types regarding the mean expression of VEGF, being higher among epithelial tumors than in mesenchymal ones. The PS, PI and RI associated with the expression of VEGF and its receptors have been shown to be relevant to characterize neovascularization of malignant tumors, and the greater expression of VEGF in epithelial mammary tumors than mesenchymal ones, may be an auxiliary indicator in the characterization of malignant breast cancers in bitches.

Key-words: Neoplasm, dogs, Doppler, ATR1, VEGF

INTRODUÇÃO

Tumor mamário canino é considerado a neoplasia mais comum em cadelas não castradas, atingindo uma taxa média superior a 50% dos tumores que acometem fêmeas desta espécie (Feliciano *et al.*, 2012a), e determinando interesse crescente sobre sua avaliação uma vez que podem servir como modelo animal para estudo em humanos, dada a semelhança dos aspectos tumorais entre as espécies (Cassali *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas foi estabelecido através de pesquisas, que como condição essencial para o desenvolvimento tumoral, faz-se necessário a manutenção de um adequado suprimento sanguíneo das células neoplásicas. Esta perfusão tecidual exacerbada se deve ao desenvolvimento de microvasos a partir de células endoteliais pertencentes a capilares circunjacentes às células tumorais, processo denominado de neovascularização ou angiogênese (Folkman e Klagsbrun, 1987; Pinho, 2005).

A ultrassonografia Doppler é uma ferramenta que permite a obtenção de informações em tempo real, sobre variados aspectos hemodinâmicos dos vasos, como a presença, a direção e o tipo de fluxo sanguíneo (Carvalho *et al.*, 2008). A perfusão sanguínea de processos tumorais também tem sido alvo de pesquisas através da ultrassonografia Doppler, correlacionando seus resultados a possíveis prognósticos de cada lesão (Nastri *et al.*, 2011).

O padrão de crescimento neoplásico está relacionado ao desenvolvimento de neovascularizações, a qual ocorre em decorrência de diversos fatores locais estimulantes deste processo (Pinho, 2005). Uma vasta gama de fatores de crescimento já foram identificados como promotores ou inibidores da angiogênese (Ribatti *et al.*, 2002), dentre os quais pode-se citar a Angiotensina II (ANG II) e o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) como estimuladores da formação de vasos sanguíneos (Feliciano *et al.*, 2012b).

A ANG II é o peptídeo biologicamente ativo do sistema renina - angiotensina, constituindo um regulador importante da homeostase cardiovascular, além de ser reconhecido como um potente mitógeno (Deshayes e Nahmias, 2005). A ANG II também apresenta atuação em variados processos patológicos, sendo descrita como componente participativo da migração e proliferação celular, podendo estar envolvida em formações neoplásicas (Nouet e Nahmias, 2000). Seu receptor ATR1, já foi identificado com incremento de sua expressão em mulheres com carcinoma mamário (De Paepe *et al.*, 2001). Outros estudos constataram ainda que estes receptores atuam no aumento dos níveis do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), sugerindo a atuação do ANG II na permeabilidade vascular (Zhang *et al.*, 2004).

O VEGF, também chamado de Fator de Permeabilidade Vascular (VPF), é considerado como um potente mitógeno de células endoteliais e tem sido o fator pró-angiogênico mais estudado na oncologia humana (Rebêlo, 2009). O aumento da expressão de VEGF tem sido correlacionado com o aumento do risco de metástase em variados tumores humanos, entre eles as neofomações do tecido mamário (Pavlakis *et al.*, 2008). Na medicina veterinária, no entanto, apenas estudos mais recentes tem se dedicado na avaliação do VEGF na rotina oncológica dos animais de companhia, havendo escassas informações referentes à relação entre a expressão gênica deste fator e características hemodinâmicas destas espécies (Feliciano *et al.*, 2012b).

Face ao exposto e visando a associação da ultrassonografia Doppler com a análise da expressão gênica de fatores angiogênicos, objetivou-se neste estudo avaliar o comportamento da perfusão tumoral, visando melhorar a caracterização das massas neoplásicas, e assim possibilitar melhor orientação da conduta terapêutica para cada caso.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 27 cadelas provenientes do atendimento do Hospital Veterinário, sendo estas encaminhadas com prévia avaliação clínica e laboratorial, sem distinção por

idade ou raça para a seleção do grupo amostral. Para cada cadela avaliada, foi realizada uma ficha de identificação com os dados relacionados ao histórico reprodutivo das mesmas e principais características tumorais dos mesmos.

Este projeto foi encaminhado para a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco, apresentando licença de número 0095/2015.

Exame Ultrassonográfico

Os animais foram submetidos à tricotomia do abdômen previamente à realização dos exames, sendo todas as avaliações ultrassonográficas realizadas com ultrassom (VetMed - Mindray®) apresentando transdutor microconvexo multifrequencial (6 a 8 MHz), e sendo estabelecido o uso da maior frequência para análise das lesões tumorais. Durante a avaliação ultrassonográfica não foi realizada sedação ou anestesia, o paciente permanecendo em decúbito lateral direito/esquerdo apenas com contenção física.

Foi realizada a análise da massa pelo modo bidimensional, com o objetivo de identificação das estruturas vasculares. Uma vez localizados os vasos de maior calibre, foi aplicada a técnica do Doppler Colorido, seguida do Doppler Pulsado para a avaliação dos fluxos arteriais e venosos presentes na lesão neoplásica. Foi realizada a correção do ângulo de insonação entre o fluxo de Doppler e a direção do segmento vascular para aproximadamente 60°, onde foram obtidos e avaliados três ciclos consecutivos de velocidades e amplitudes similares, de cada vaso. A velocidade de pico sistólico (PS), velocidade diastólica final (ED), velocidade média do ciclo (TAMAX), relação sístole / diástole (S/D), assim como os valores do Índice de Resistividade (RI) (Pourcelot, 1974) e Índice de Pulsatilidade (PI) (Gosling *et al.*, 1971) da neovascularização tumoral foram calculados automaticamente pelo software do ultrassom (Figura 1).

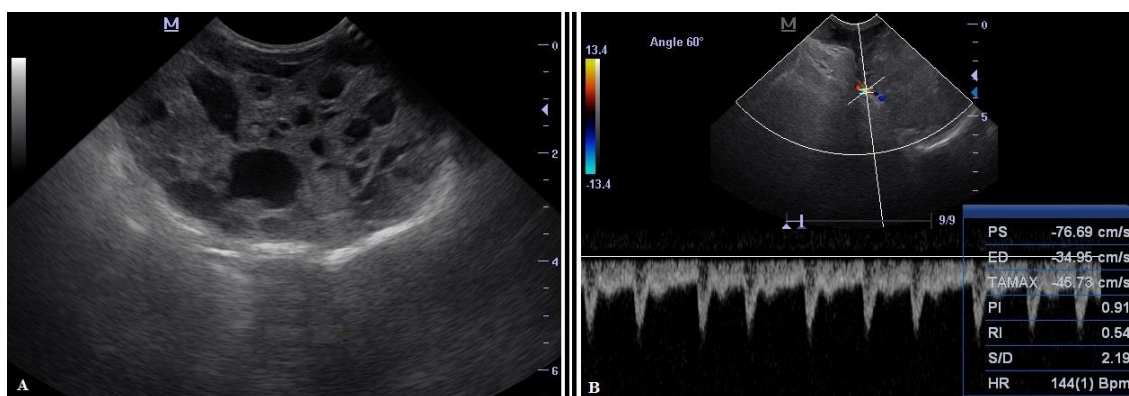


Figura 1: A) Imagem ultrassonográfica de tumor de mama canino de aspecto cavitário, apresentando ecogenicidade mista e ecotextura heterogênea; B) Dopplerfluxometria do nódulo mamário com avaliação dos principais parâmetros hemodinâmicos da lesão.

Análise histopatológica

Realizados os exames ultrassonográficos, as cadelas foram submetidas à ressecção cirúrgica da cadeia mamária acometida e respectivas nodulações, com posterior obtenção das medidas tumorais e coleta do fragmento para análise histopatológica (Figura 2).

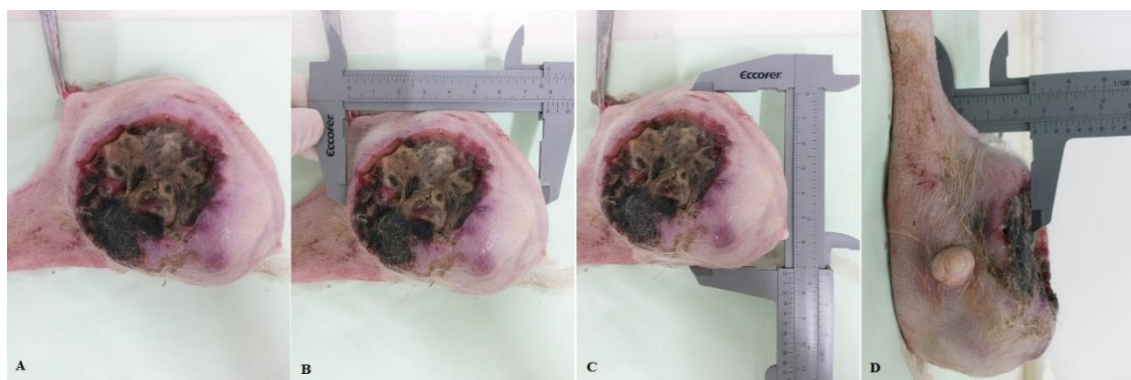


Figura 2: Ressecção cirúrgica de neoplasia mamária ulcerada (A). Imagens B, C e D demonstram respectivamente a mensuração de largura, comprimento e altura da massa tumoral.

As amostras foram fixadas em formaldeído 10% (v/v) preparado em PBS 0,01M e pH 7,2. Os fragmentos foram submetidos à clivagem, sendo em seguida processados de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em blocos de parafina, cortados em micrótomo rotativo 4 micrômetros e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (HE), segundo metodologia descrita por Behmer *et al.* (1976). O diagnóstico histopatológico baseou-se na classificação proposta por Cassali *et al.* (2014). Nos casos em que não houve a confirmação histopatológica de neoplasia mamária, foi determinada a exclusão do animal do grupo amostral.

Coleta de amostras tumorais

Foram coletadas aproximadamente 2 a 3g de tecido tumoral de cada amostra selecionada, sendo as mesmas acondicionadas em criotubos de 2 mL acrescido de TRI[®] Reagente. As amostras foram transportadas em temperatura de 4 °C ao laboratório, sendo em seguida armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) para posterior isolamento do RNA total.

Extração do RNA total e Transcriptase Reversa

Para o isolamento do RNA total as amostras de tecido tumoral foram maceradas utilizando-se lâminas de bisturi e pinça, sendo em seguida realizado o protocolo (Trizol) sugerido pelo fabricante com modificações.

Para a extração foi adicionado 500 µL de TRI[®] Reagente por amostra e deixado em repouso por 15 minutos, em seguida adicionou-se 100 µL de clorofórmio (P.A) e repouso por mais 15 minutos. As amostras foram centrifugadas na rotação de 12.000g por 15 minutos, o qual em seguida foi retirado 500 µL de sobrenadante e adicionado em um novo tubo coletor de 1,5mL. Ao sobrenadante coletado adicionou-se a mesma proporção (1:1) de Isopropanol (P.A) e deixado 12 horas em freezer (-20 °C) para prosseguir a extração. Após o descanso, as amostras foram centrifugadas na rotação de 12.000g por 15 minutos e descartado calmamente o sobrenadante. Ao tubo foi adicionado 500 µL de etanol 70%, para retirar impurezas, e centrifugado na rotação máxima por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi novamente descartado e o tubo deixado em repouso por 15 minutos, ao qual foi adicionado água MilliQ para a eluição do RNA total.

Para eliminar a contaminação com DNA genômico, todas as amostras de RNA foram tratadas com RNA-free DNase (Promega, Madison, USA). O RNA foi quantificado pela absorbância em 260 nm e a pureza do RNA foi determinada baseada na relação de 260/280 nm por espectrofotometria (NanoVue - PLUS[™]) e somente amostras com relação entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas.

Na obtenção do DNA complementar total (cDNA) foi utilizado o Kit ImProm-II[™] Reverse Transcription System (Promega[®]), sendo adicionado 1 µL do oligonucleotídeo iniciador (Oligo(dT)15) e random ao volume de 4 µL do RNA total. Todas as amostras foram padronizadas para 1µg, em seguida incubado em termobloco a 70 °C por 5 minutos e esfriado a 4 °C por 5 minutos. A essa mistura foi adicionado 4 µL do buffer Improm-II[™] (5X), 2,4 µL de MgCl₂ (1,5 mM), dNTP (0,5mM de cada dNTP) e 1,0 da enzima transcriptase reversa Improm-IITM, totalizando um volume final de 20 µL da reação, incubada em termobloco 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 60 minutos e inativação da enzima em 70 °C por 15 minutos.

PCR Real-Time (qPCR)

A expressão do mRNA para os genes relacionados à neovascularização (VEGF, FLT-1, FLK-1, ATR1) avaliada a partir da amplificação de segmentos dos genes com os oligonucleotídeos iniciadores estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos usados para a amplificação de cada gene em reações de PCR Real-Time

Genes	Sequência	Amplificação (bp)	Referência / GeBank
VEGF	F: CAGTGCCTCTCTCTCAAGGC	127	XM_540047.5
	R: GCTGGCAGGGAACGTCTAAT		
FLT-1	F: AGTAGCACTCTGCTGGCTTC	130	XM_534520.5
	R: GTGTGAGGTCAGAAAGCCCC		
FLK-1	F: CACGGAGTTGAGCTGTCTGT	89	NM_001048024.1
	R: TCCCAGTTGAAGTCAAGCCC		
ATR1	F: TTTTAGCCGCATCTCCAGGG	123	XM_005634552.2
	R: AGGCTTTTGGCCAGATCCAA		
GAPDH	F: GTAGTGAAGCAGGCATCGGA	108	NM_001003142.2
	R: GTCGAAGGTGGAAGAGTGGG		

Todos os primers foram construídos utilizando o programa Pick primer disponível no banco de dados do National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD (NCBI). As sequências apresentaram 100% de homologia para a espécie canina.

As reações de Real-time PCR foram realizadas com o *kit* de amplificação MeltDoctor™ HRM-Master Mix (Applied Biosystems), em termociclador (Rotor-Gene Q da Qiagen®), as reações foram realizadas em duplicadas com controle negativo para identificar reações inespecíficas.

Em cada reação foram utilizados 2,0 µL do cDNA (100ng/µL), 10 µL do HRM-Master Mix, 0,5 µL de primer sense e anti-sense (10 pM) e 7,0µL de H₂O Milli Q, totalizando um volume final de 20 µL. Os seguintes ciclos foram empregados: temperatura inicial de 95°C por 10 min (ativação da enzima), 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 60 segundos (captação da fluorescência). As condições do Melting foram: temperatura de 60 a 95°C, com incremento de 0,5°C/5segundos.

O gene de referência utilizado para normalizar as expressões dos genes em estudo foi o GAPDH. A quantificação relativa da expressão dos genes foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Análise Estatística

Os dados que não foram normalmente distribuídos de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov, foram transformados em logaritmo natural.

Para avaliação da relação entre os genes e as variáveis Doppler, agrupados por tipo tumoral, foi realizada análise de correlação de Pearson. Para avaliar o comportamento do tipo tumoral em relação as variáveis Doppler e gênicas, utilizou-se análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey, para testar as diferenças entre as médias. Foi considerado significativo o valor de $P \leq 0.05$. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão da média.

RESULTADOS

Entre as 27 amostras avaliadas foram identificados ao exame histopatológico, 22 tumores de origem epitelial e cinco tumores de origem mesenquimal. No que se refere a avaliação Dopplerfluxométrica, sete lesões neoplásicas não apresentaram vascularização mensurável através do exame, três das quais não foram, ao menos, detectadas a presença de fluxo vascular.

Através da análise dos dados foi observada correlação positiva entre o receptor FLT-1 e as variáveis Doppler de PS ($r = 0,22$, $P = 0,05$), PI ($r = 0,93$, $P < 0,0001$) e RI ($r = 0,46$, $P = 0,05$). O receptor FLK-1 apresentou correlação igualmente positiva com os parâmetros PS ($r = 0,28$, $P = 0,03$) e PI ($r = 0,96$, $P < 0,0001$) e uma tendência para RI ($r = 0,45$, $P = 0,07$). O VEGF apresentou correlação positiva com PI ($r = 0,47$, $P = 0,05$). Não foram observadas correlações significativas entre os demais genes e variáveis Dopplerfluxométricas.

Foram observadas correlações significativas entre a expressão dos genes estudados. O VEGF apresentou correlação positiva com seus receptores FLT-1 ($r = 0,92$, $P = 0,0001$) e FLK-1 ($r = 0,34$, $P = 0,0052$), porém não apresentou correlação com o receptor da angiotensina (ATR1) ($r = 0,004$, $P = 0,8656$). Os receptores de VEGF também apresentaram correlação positiva entre si ($r = 0,94$, $P < 0,0001$) e com o ATR1 (FLT-1: $r = 0,49$ / $P = 0,0250$; FLK-1: $r = 0,63$ / $P = 0,0106$).

Quanto ao tipo histológico tumoral, não houve correlação significativa com os parâmetros ultrassonográficos analisados.

Houve diferença significativa entre os tipos tumorais quanto à expressão média do VEGF sendo maior entre os tumores epiteliais do que nos mesenquimais, no entanto não foi observada a mesma diferença com as demais expressões gênicas, bem como com as variáveis Doppler. Os dados estão representados na figura 3 e tabela 2.

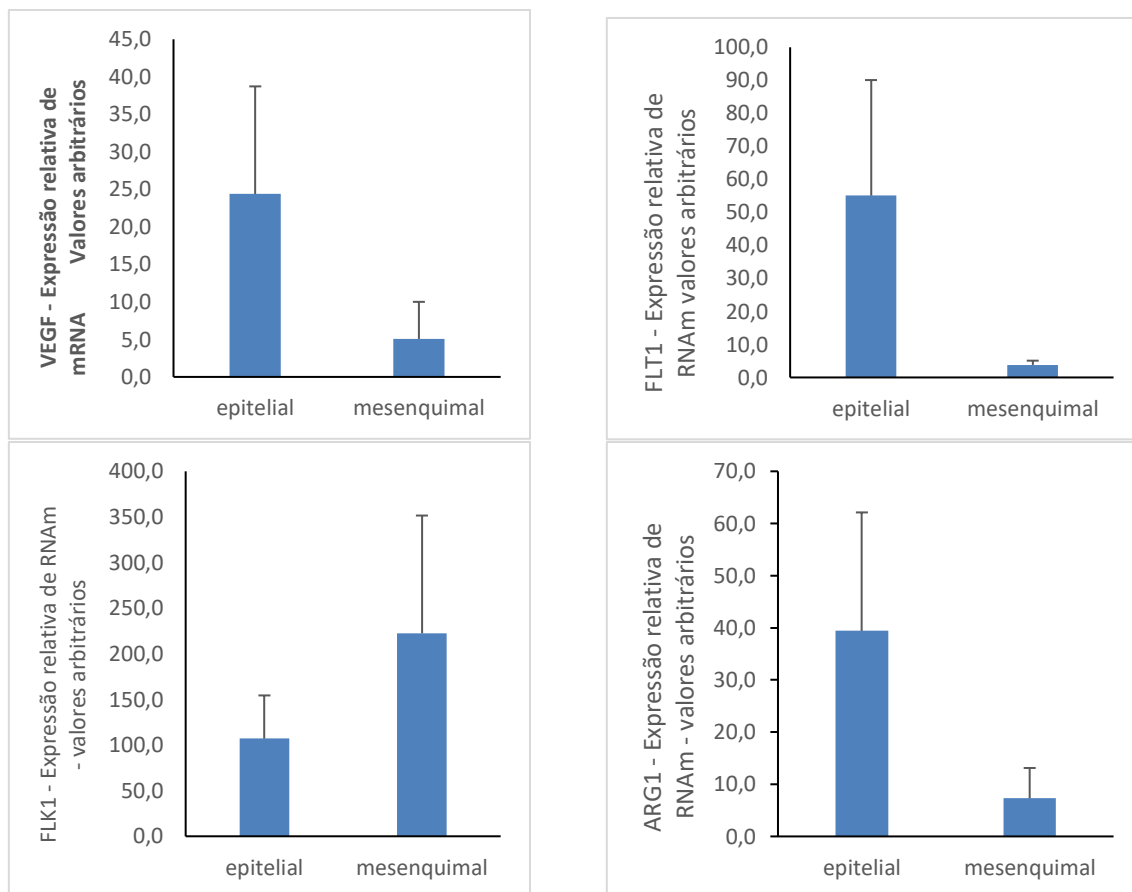


Figura 3: Médias e erro padrão da expressão dos genes avaliados em tumores mamários de origem epitelial e mesenquimal de cadelas.

Tabela 2: Médias e desvio padrão dos dados Dopplerfluxométricos de tumores mamários de origem epitelial e mesenquimal em cadelas

Parâmetros Doppler	Tumores epiteliais	Tumores mesenquimais
PS	79,92 ± 41,76	84,85 ± 30,00
ED	20,88 ± 12,37	29,90 ± 4,60
TAMAX	35,61 ± 18,37	48,79 ± 15,71
S/D	5,61 ± 5,28	2,78 ± 0,63
RI	0,71 ± 0,14	0,63 ± 0,09
PI	1,97 ± 2,13	1,08 ± 0,21

PS = pico sistólico; ED = diastólica final; TAMAX = velocidade média do ciclo; S/D = relação sístole/diástole; RI = índice de resistividade; PI = índice de pulsatilidade

DISCUSSÃO

O maior número de neoplasias mamárias de origem epitelial no grupo experimental utilizado neste estudo corrobora com a descrição sobre neoplasias mamárias

malignas já descrita por pesquisas anteriores. O carcinoma mamário é considerado o mais frequentemente observado em cadelas, ao passo que os sarcomas apresentam menor incidência nesta espécie (Misdorp *et al.*, 1999).

A aplicação do estudo Doppler em nódulos mamários baseia-se na detecção de angiogênese tumoral promotora da formação de vasos dentro e em torno da neoplasia (Nastri *et al.*, 2011). Nos tumores analisados não foi possível a mensuração Dopplerfluxométrica da totalidade das amostras, evidência que também ocorreu em outros estudos em pacientes humanos (Chao *et al.*, 1999; del Cura *et al.*, 2005) e caninos (Feliciano *et al.*, 2012b). Este fato está possivelmente associado ao pequeno tamanho de algumas massas tumorais que inviabilizaram a correta visualização das neovascularizações. Como descrito por Nyman *et al.* (2006) a identificação dos vasos depende dos seus respectivos tamanhos, apesar da relevante sensibilidade da técnica. Além disso, a capacidade de detecção de fluxo por este método está diretamente relacionada à obtenção do correto ângulo de insonação entre o vaso sanguíneo e o feixe sonoro, devendo o mesmo estar perpendicular um em relação ao outro (Carvalho *et al.*, 2008).

Quanto aos diferentes estudos ultrassonográficos já realizados acerca de tumores mamários caninos, apenas alguns descrevem a análise hemodinâmica das lesões e suas respectivas velocidades e índices Doppler (Nyman *et al.*, 2006; Feliciano *et al.*, 2012b). Na medicina humana, entre as variáveis ultrassonográficas analisadas em estudos oncológicos, a PS tem se mostrado como importante indicador de malignidade das lesões, sendo descrito que picos acima de 20 cm/s estão significativamente relacionados a lesões malignas (Dock *et al.*, 1991). O fato dos valores médios de PS neste estudo terem sido bem superior a 20 cm/s sugere que este parâmetro também seja um critério importante para caracterização de neoplasias mamárias malignas em cadelas.

A real importância do RI na diferenciação tumoral é controversa na literatura. Alguns autores consideram que avaliação do RI é importante para auxílio na diferenciação de neoplasias malignas e benignas, onde massas com altos valores de RI sugerem maior grau de malignidade (Gokalp *et al.*, 2009). Entretanto, outros estudos citam que o desenvolvimento de vasos patológicos em carcinomas, devido à resposta a fatores angiogênicos, pode levar à diminuição da resistência do fluxo sanguíneo intratumoral (Feliciano *et al.*, 2008). Em cadelas, a estimativa do RI parece não ser uma ferramenta útil para a caracterização de tumores mamários malignos. Apesar dos nossos resultados demonstrarem correlação significativa desta variável com os fatores de

angiogênese tumoral, a mesma foi classificada como fraca, assim como descrito por Feliciano *et al.* (2012b) que não conseguiram estabelecer relação entre o RI e PI com o grau de malignidade das lesões.

Neste estudo foi observada alta correlação da variável PI com a maioria dos fatores angiogênicos analisados (VEGF, FLT-1 e FLK-1), estando este achado possivelmente relacionado a influência destes genes no aumento da perfusão tumoral. Como descrito por Yonemaru *et al.* (2006), a expressão do VEGF simultaneamente à dos seus receptores presentes nas células endoteliais, está associada ao aumento da vascularização, assim como ao desenvolvimento de processos malignos. Em humanos valores aumentados de PI e RI podem indicar uma tendência de malignidade de tumores mamários, porém este não deve ser considerado como o principal critério de malignidade (del Cura *et al.*, 2005). Estudos em mulheres apontam que, apesar dos valores médios de PI e RI serem comprovadamente superiores nos tumores mamários malignos, quando se analisa os valores médios e respectivos desvio padrões existe uma sobreposição dos valores de PI e RI, impossibilitando o estabelecimento de um ponto de corte entre processos malignos e benignos (Youssefzadeh *et al.*, 1996; Chao *et al.*, 1999).

Um dos primeiros estudos da medicina veterinária sobre VEGF em neoplasias mamárias de cães, já descreviam relevante importância deste fator na promoção da angiogênese e crescimento tumoral (Graham e Myers, 1999). A positiva correlação encontrada neste estudo entre a variável PS e os receptores do VEGF podem estar relacionados à influência que o FLT-1 e FLK-1 desempenham no aumento da permeabilidade e dilatação vascular, além do crescimento tumoral e inibição da apoptose (Restucci *et al.*, 2002). Neste estudo o valor médio da expressão do VEGF foi maior entre os tumores epiteliais quando comparado com a média dos tumores mesenquimais. Como descrito por Yoshiji *et al.* (1996), a expressão gênica do VEGF apresenta valores de destaque nos carcinomas mamários de mulheres quando comparado com outros marcadores tumorais, indicando que o VEGF pode apresentar um papel crucial na angiogênese de tumores epiteliais. Apesar de existirem limitadas pesquisas analisando o VEGF em tumores mamários caninos (Feliciano *et al.* 2012b), sabe-se que seu aumento demonstra associação com maior agressividade do tumor e pode ser uma ferramenta auxiliar para estabelecimento do prognóstico de pacientes (Nociti *et al.*, 2015).

O receptor de angiotensina II, o ATR1, apesar dos seus já descritos níveis de expressão aumentados no tumor de mama de mulheres (De Paepe *et al.*, 2001), não demonstrou significativa relação com a expressão do VEGF, bem como com as variáveis

Doppler. Este fato está possivelmente relacionado a obtenção de resultados muito variáveis para este gene neste estudo, incluindo amostras em que não foi obtida nenhuma expressão do mesmo.

CONCLUSÃO

Os parâmetros Doppler PS, PI e RI, associados com a expressão do VEGF e seus receptores, mostraram-se relevantes para caracterizar a neovascularização de tumores malignos, independente do tipo tumoral.

A maior expressão do VEGF em tumores mamários epiteliais do que mesenquimais pode ser um indicador auxiliar na caracterização de neoplasias mamárias malignas em cadelas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, C.F.; CHAMMAS, M.C.; CERRI, G.G. Princípios físicos do Doppler em ultra-sonografia. *Ciênc. Rural*. v.38, n.3, p. 872-879, 2008.

CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; FERREIRA, E. et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. *Braz. J. Vet. Pathol.*, v. 7, n. 2, p. 38-69, 2014.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS-NETO, A.G. *Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica*. São Paulo: Edart, 1976. 256 p.

CHAO, T.; LO, Y.; CHEN, S.; CHEN, M. Color Doppler ultrasound in benign and malignant breast tumors. *Breast Cancer Res Tr*. v.57, p. 193-199, 1999.

DESHAYES, F.; NAHMIAS, C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrin Met*, v.16, n. 7, p. 293-299, 2005.

De PAEPE, B.; VERSTRAETEN, V. L.; De POETTER, C. R.; VAKAET, L. A., BULLOCK, G. R. Growth stimulatory angiotensin II type-1 receptor is upregulated in breast hyperplasia and in situ carcinoma but not in invasive carcinoma. *Histochem. Cell Biol.*, v. 116, n. 3, p. 247-254, 2001.

del CURA, J. L.; ELIZAGARAY, E.; ZABALA, R.; LEGÓRBURU, A.; GRANDE, D. The use of unenhanced Doppler sonography in the evaluation of solid breast lesions. *AJR Am J Roentegenol*, v.184, n.6, p.1788-1794, 2005.

DOCK, W.; GRABENWOGER, F.; METZ, V. et al. Tumor vascularization: assessment with Duplex Sonography. *Radiology* v.181, p. 241-244, 1991.

FELICIANO, M.R.A.; VICENTE, W.R.R; LEITE, C.A.L; SILVEIRA, T. Abordagem ultrassonográfica da neoplasia mamária em cadela: revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim* v.32, n.3, p.197-201, 2008.

FELICIANO, M.A.R.; JOÃO, C.F.; CARDILLI, D.J. et al. Neoplasia mamária em cadelas – revisão de literatura. *Rev.Cient.Elet.Med.Vet: Ano IX*, n. 1, 2012a.

FELICIANO, M. A. R.; VICENTE, W. R. R.; SILVA, M. A. M. Conventional and Doppler ultrasound for the differentiation of benign and malignant canine mammary tumours. *J Small Anim Pract* v.53, n.6, p.332–337, 2012b.

FOLKMAN, J; KLAGSBRUN, M. Angiogenic Factors. *Science*, v.235, p. 442-447, 1987.

GOKALP, G.; TOPAL, U.; KIZILKAYA, E. Power Doppler sonography: anything to add to BI-RADS US in solid breast masses? *Eur J Radiol.* v.70, n.1, p.77-85, 2009.

GRAHAM, J. C.; MYERS, R. K. The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. *J Vet Intern Med* v.13, n. 3, p. 416-418, 1999.

GOSLING, R. G.; DUNBAR, G.; KING, D. H.; NEWMAN, D. L.; SIDE, C. D.; WOODCOCK, J. P.; FITZGERALD, D. E.; KEATES, J. S.; MACMILLAN, D. The quantitative analysis of occlusive peripheral arterial disease by a non-intrusive ultrasonic technique. *Angiology*, v. 22, n.1, p. 52–55, 1971.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* v.25, n.4, p.402–408, 2001.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, E. Definitions and explanatory notes. In: WHO histological classification of mammary tumors of the dog and cat. washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999, 18-27.

NASTRI, C. O.; MARTINS, W. P.; LENHARTE, R. J. Ultrassonografia no Rastreamento de Câncer de Mama. *Femina*, v.39, n.2, p.97-102, 2011.

NOCITI, R. P.; MACENTE, B. I.; TAVARES, M. R.; SANTOS, F. C.; CAMACHO, R. R.; VICENTE, W. R. R.; FELICIANO, M. A. R. O papel do fator de crescimento endotelial (VEGF) na formação e progressão de neoplasias mamárias de cadelas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.39, n.3, p.341-346, 2015.

NOUET, S.; NAHMIA, C. Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol Metab*, v.11, n.1, p. 1–6, 2000.

NYMAN, H. T.; NIELSEN, O. L.; MCEVOY, F. J. et al. Comparison of B-mode and Doppler ultrasonographic findings with histologic features of benign and malignant mammary tumors in dogs. *Am J Vet Res* v.67, n.6, p. 985-991, 2006.

PAVLAKIS, K.; MESSINI, I.; VREKOUSSIS, T.; YIANNOU, P.; KERAMOPOULLOS, D.; LOUVROU, N.; LIAKAKOS, T.; STATHOPOULOS, E. The assessment of angiogenesis and fibroblastic stromagenesis in hyperplastic and pre-invasive breast lesions. *BMC Cancer*, v. 8, p. 88, 2008.

PINHO, M. S. L. Angiogênese: O gatilho proliferativo. *Rev Bras Coloproct*, v. 25, n.4, p. 396-402, 2005.

POURCELOT, L. Applications clinique de l'examen Doppler transcutane. In: P. PERONNEAU (Ed.) *Velocimetrie ultrasonore Doppler*. Paris: Semin Inserm, 1974. p. 213-40.

REBÊLO, A. M. G. **Invasive ductal carcinoma of the breast: relationship between the immunohistochemical expression of endothelial growth factor (VEGF) and BCL-2 oncogene with tumor size and status of the sentinel nodes at the time of histopathological diagnosis of neoplasm.** 2009. 74f. Dissertação (mestrado) - University of Brasília, 2009.

RESTUCCI, B.; PAPPARELLA, S.; MAIOLINO, P.; VICO, G. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, v.39, p. 488-493, 2002.

RIBATTI, D.; VACCA, A.; PRESTA, M. The Discovery of angiogenic factors: A historical review. *Gen Pharmacol*, v. 35, n.5, p. 227-231, 2002.

YONEMARU, K.; SAKAI, H.; MURAKAMI, M.; YANAI, T.; MASEGI, T. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and their receptor (Flt -1, Flk-1, and Flg-1) in canine vascular tumours. *Vet Pathol*, v.43, n.3, p. 971-980, 2006.

YOSHIJI, H.; Gomez, D. E.; Shibuya, M.; Thorgeirsson, U. P. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Its Receptor, and Other Angiogenic Factors in Human Breast Cancer. *Cancer Res*, v. 56, p. 2013-2016, 1996.

YOUSSEFZADEH, S.; EIBENBERGER, K.; HELBICH, T.; JAKESZ, R.; WOLF, G. Use of Resistance Index for the Diagnosis of Breast Tumours. *Clin Radiol*, v.51, p. 418-420, 1996.

ZHANG, X.; LASSILA, M.; COOPER, M. E.; CAO, Z. Retinal expression of vascular endothelial growth factor is mediated by angiotensin type 1 and type 2 receptors. *Hypertension*, v. 43, p. 276–281, 2004.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ❖ O método BI-RADS está relacionado com o grau de malignidade das lesões neoplásicas sugerindo a viabilidade de aplicação clínica da técnica em cadelas;
- ❖ O uso desta classificação deve ser estimulado para um melhor planejamento do tratamento cirúrgico e/ou quimioterápico dessa espécie;
- ❖ Na avaliação ultrassonográfica pela técnica do histograma dos níveis de cinza, a ecogenicidade não se caracterizou como um fator prognóstico significativo;
- ❖ O parâmetro de ecotextura obtido pelo histograma demonstrou alta correlação com o grau de malignidade dos tumores, sugerindo sua aplicabilidade como fator decisivo para orientação sobre a conduta terapêutica.
- ❖ Os parâmetros Doppler PS, PI e RI, associados com a expressão do VEGF e seus receptores, mostraram-se relevantes para caracterizar a neovascularização de tumores malignos, independente do tipo tumoral.
- ❖ A maior expressão do VEGF em tumores mamários epiteliais do que mesenquimais pode ser um indicador auxiliar na caracterização de neoplasias mamárias malignas em cadelas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, A. V. PEREIRA, W. C. A.; INFANTOSI, A. F. C.; AZEVEDO, C. M. (2007) Complexity curve and grey level co-occurrence matrix in the texture evaluation of breast tumor on ultrasound images. *Med Phys* 34(2):379 – 387.

ALVARENGA, A. V.; INFANTOSI, A. F. C.; WAGNER C. A. PEREIRA, W. C. A.; AZEVEDO, C. M. (2012) Assessing the combined performance of texture and morphological parameters in distinguishing breast tumors in ultrasound images. *Med Phys* 39(12):7350-7358.

AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY. Breast imaging reporting and data system (BI-RADS) 1nd ed. Reston, Va: American College of Radiology, 1993.

AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY. Breast Imaging Reporting and Data System Ultrasound (BIRADS™-Ultrasound). Reston: American College of Radiology; 2003.

AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY. Breast imaging reporting and data system (BI-RADS) 5nd ed. Reston, Va: American College of Radiology, 2013.

AMORIM, R. L. Imunoistoquímica em oncologia veterinária. In: DALECK, C.R. et al. (Eds.) *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Roca, 2009. cap.8, p.135-150.

ANTUOFERMO E, MILLER, M.A, PIRINO, S, XIE, J, BADVE, S, MOHAMMED, 225 S.I. (2007). Spontaneous Mammary Intraepithelial Lesions in Dogs – A Model of Breast 226 Cancer. *Cancer Epidem Biomar* 16(11):2247-2256.

ARGYLE, D.J., KHANNA, C. Tumor biology and metastasis. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. (Eds.) *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. 4.ed. Philadelphia: Saunders, 2007. cap.2, p.31-53.

AZEVEDO-MARQUES, P. M. (2001) Diagnóstico auxiliado por computador na radiologia. *Radiol Bras*, 34(5):285-293.

AZEVEDO, C. M.; ALVARENGA, A. V.; PEREIRA, W. C. A.; INFANTOSI, A. F. C. (2009) Análise computacional da textura de tumores de mama em imagens por ultrassom de pacientes submetidas a cirurgia conservadora. *Radiol Bras*. 42(6):363–369.

BARRAS, A.A.; SILVA, S.Z.C.; GOUVÊA, A.P. (2004) A mamografia e a ultrassonografia no diagnóstico de lesões mamárias papáveis suspeitas de malignidade. *RMMG* 14(3):166-170.

BASTAN, A.; ÖZENÇ, E.; PIR, YAGCI, I. (2009) Ultrasonographic evaluation of mammary tumors in bitches. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 1(15): 81-86.

BELCHER, G.; HUBNER, R.; GEORGE, M.; ELMFELDT, D.; LUNDE, H. (1997) Candesartan cilexetil: safety and tolerability in healthy volunteers and patients with hypertension. *J Hum Hypertens* 11(suppl 2): S85e9.

BLAVIAS, M.; BRANNAM, L. (2004). Testicular ultrasound. *Emerg Med Clin N Am* 22(3):723-748.

BRODEY, R.S., GOLDSCHMIDT, M.H, ROSZEL, J.R. (1983). Canine mammary gland neoplasms. *J Am Anim Hosp Assoc*, 19:61-89.

CALAS, M.J.G.; KOCH, H.A.; DUTRA, M.V.P. (2007) Breast Ultrasound: evaluation of echographic criteria for differentiation of breast lesions. *Radiol Bras* 40(1):1-7.

CAMARGO JUNIOR, H.S.A. (2005) BI-RADS® Ultrassom: vantagens e desvantagens dessa nova ferramenta de trabalho. *Radiol Bras* 38(4):301-303.

CANTLEY, L.C.; AUGER, K.R.; CARPENTER, C.; DUCKWORTH, B.; GRAZIANI, A.; KAPPELLER, R.; SOLTOFF, S. (1991) Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64(2):281-302.

CARMELIET P, COLLEN D. (2000) Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease. *J Pathol* 190(3):387-405.

CARVALHO, C.F.; ADDAD, C.A. Doppler: histórico e princípios físicos. In: CARVALHO, C.F: *Ultrassonografia Doppler em pequenos animais*. São Paulo: Roca, 2004. cap. 1, p. 3-6

CARVALHO, T. B. **Neoplasia mamária em cadelas: caracterização histopatológica e expressão de proteínas de estresse (HSP 72)**. 2006. 49 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

CARVALHO, C.F.; CHAMMAS, M.C.; CERRI, G.G. (2008) Princípios físicos do Doppler em ultra-sonografia. *Ciênc Rural* 38(3):872-879.

CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A.B.; GHEVERS, 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. (2014) Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. *Braz. J. Vet. Pathol.* 7(2): 38-69.

CERRI, G. G.; MÓLNAR, L. J.; VEZOZZO, D. C. P. Avaliação do Doppler renal. In: _____ *Doppler*. São Paulo: Sarvier, 1998. cap. 7, p. 131-154.

CHALA LF, BARROS N. (2004) ACR BI-RADS™ na ultrasonografia. *Radiol Bras* 37(2): III-IV.

CHARNOCK- JONES, D. S.; KAUFMANN, P.; MAYHEW, T. M. (2004) Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 25(2-3):103-113.

CHIU, A.T.; HERBLIN, W.F.; MCCALL, D.E.; ARDECKY, R.J.; CARINI, D.J.; DUNCIA, J.V.; PEASE, L.J.; WONG, P.C.; WEXLER, R.R.; JOHNSON, A.L.; TIMMERMANS, P.B.M.W.M. (1989) Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 165:196-203.

COSTA, M. M. Estudo Epidemiológico e Anátomo-Patológico de Tumores Mamários na Cadela e na Gata. 2010. 135 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 2010.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.; SCHOEN, F.J. Neoplasias. In: ROBBINS, S. L. *Patologia estrutural e funcional*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 213-268.

De GASPARO, M.; CATT, K.J.; INAGAMI, T. WRIGHT, J.W. UNGER, T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52(3):415-472.

De NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A.; MACEDO, T.R.; RODIGHERI, S.M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C.H. (2002) Prevalência de neoplasias modalidade de tratamentos em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Arch Vet Sci* 7(2):15-26.

De PAEPE, B.; VERSTRAETEN, V. L. R. M.; De POTTER, C. R.; VAKAET, L. A.; BULLOCK, G. R. (2001) Growth stimulatory angiotensin II type-1 receptor is upregulated in breast hyperplasia and in situ carcinoma but not in invasive carcinoma. *Histochem Cell Biol* 116(3):247-254.

De PAEPE, B.; VERSTRAETEN, V. L. R. M.; De POTTER, C. R.; BULLOCK, G. R. (2002) Increased angiotensin II type-2 receptor density in hyperplasia, DCIS and invasive carcinoma of the breast is paralleled with increased iNOS expression. *Histochem Cell Biol* 117(1):13-19.

DESHAYES, F.; NAHMIAS, C. (2005) Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrin Met* 16(7):293-299.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. *Tratado de Anatomia Veterinária*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 840p.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19(5):403-10.

ELSTON CW., ELLIS IO. Assessment of histological grade. In: ELSTON CW., ELLIS IO. (Eds.) *Systemic Pathology. The breast*. London: Churchill Livingstone, 1998. 365-84.

FELICIANO, M.R.A.; VICENTE, W.R.R; LEITE, C.A.L; SILVEIRA, T. (2008) Abordagem ultrassonográfica da neoplasia mamária em cadela: revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim* 32(3):197-201.

FELICIANO, M. A. R.; JOÃO, C. F.; CARDILLI, D. J.; CRIVELARO, R. M.; VICENTE, W. R. R. (2012a) Neoplasia mamária em cadelas – revisão de literatura. *Rev Cient Elet Med Vet Ano IX* (1).

FELICIANO, M. A. R.; VICENTE, W. R. R.; SILVA, M. A. M. (2012b) Conventional and Doppler ultrasound for the differentiation of benign and malignant canine mammary tumours. *J Small Anim Pract* 53(6):332–337.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18(1):4-25.

FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A.C.; CAVALCANTI, M.F.; SCHMITT, F.C.; CASSALI, G.D. (2009) The relationship between tumor size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumors. *Vet Comp Oncol* 7(4):230-5.

FILHO, O. O. S. F.; NARDOZZA, L. M. M.; JUNIOR E. A.; ROLO, L. C.; CAMANO, L.; MORON, A. F. (2009) Estudo da cicatriz uterina de cesariana avaliada pelo histograma escala-cinza. *Rev Assoc Med Bras* 56(1):99-102.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. (1987) Angiogenic Factors. *Science* 235 (4787):442-447.

FOLKMAN, J. Carcinoma of the Colon and Antecedent Epithelium. In: W. J. Burdette (Ed.). Thomas, Springfield, IL, 1970, pp. 113-127.

FOLKMAN, J. (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82(1): 4–6.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. (1992) Angiogenesis. *J Biol Chem* 267(16):10931–10934.

FOSSUM, T.W. Surgery of the reproductive and genital systems. In T.W. FOSSUM, C.S. HEDLUND, A.L. JOHNSON, K.S. SCHULZ, H.B. SEIM III, M.D. WILLARD, A. BAHR, G.L. CARROL (Eds.), *Small animal surgery*, 3rded. Missouri, UK: Mosby Elsevier, 2007. p.729-739.

FUJITA, M.; HAYASHI, I.; YAMASHINA, S.; ITOMAN, M.; MAJIMA, M. (2002) Blockade of angiotensin AT1a receptor signaling reduces tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 294(2):441-447.

FUJITA, M.; HAYASHI, I.; YAMASHINA, S.; FUKAMIZU, A.; ITOMAN, M.; MAJIMA, M. (2005) Angiotensin type 1a receptor signaling-dependent induction of vascular endothelial growth factor in stroma is relevant to tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Carcinogenesis* 26(2):271-279.

GENTILINI, F.; CALZOLARI, C.; TURBA, M.E.; AGNOLI, C.; FAVA, D.; FORNI, M.; BERGAMINI, P. F. (2005) Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and plasma activity of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 in lymphoma-affected dogs. *Leuk Res* 29(11):1263 – 1269.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. (2011) Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Vet Pathol* 48(1):117-131.

GONZALES DE BULNES, A.; GARCIA FERNANDEZ, P.; MAYENCO AGUIRRE, A.M.; SANCHES DE LA MUELA, M. (1998) Ultrasonographic imaging of mammary tumours. *Vet Rec* 143(25):687-689.

GREENHOUGH, R.B. (1925) Varying degrees of malignancy in cancer of the breast. *J. Cancer Res* 9(4): 452-463.

HARRINGTON, K.; HECHER, K.; CAMPBELL, S. The fetal haemodynamic response to hypoxia. In: HARRINGTON, K, CAMPBELL S, (Eds) *A Color Atlas of Doppler Ultrasonography in Obstetrics*. London: Edward Arnold, 1995. p. 81-94.

HARTVEIT F. (1971) Prognostic typing in breast cancer. *Br. Med. J.* 4(5782): 253-257.

HASHIMOTO, S; YAMAMURA, H.; SATO, T.; KANAYAMA, K.; SAKAI, T. (2002). Prevalence of mammary gland tumor of small breed dogs in the Tokyo metropolitan area. *Journal of Veterinary Epidemiology*, 6(2): 85-90.

HELPER, L. C. Diagnosis of pregnancy in the bitch with an ultrasonic Doppler instrument (1970) *J Am Vet Med Assoc* (1) 56: 60–62.

- HENRY, C. J. Tumors of the abdominal cavity – Section F: Mammary tumors. In: HENRY, C. J. & HIGGIBOTHAM, M. L. *Cancer management in small animal practice*, Missouri, USA: Saunders Elsevier, 2010. p. 275-282.
- HERR, D.; RODEWALD, M.; FRASER, H. M.; HACK, G.; KONRAD, R.; KREIENBERG, R.; WULFF, C. Potential role of Renin–Angiotensin-system for tumor angiogenesis in receptor negative breast cancer (2008) *Gynecol Oncol* 109(3):418-25.
- HOLEY, R. J.; SCOUTT, L. M.; PHILPOTTS, L. E. (2013) Breast Ultrasonography: State of the Art. *Radiology* 268(3):642-659.
- IVANCIC, M.; MAI, W. (2008) Qualitative and quantitative comparison of renal vs. hepatic ultrasonographic intensity in healthy dogs. *Vet Radiol Ultrasoun* 49(4):368-373.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In L.C. JUNQUEIRA, J. CARNEIRO (Eds.) *Histologia básica* (10thed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 449-452.
- KATO, Y.; ASANO, K.; MOGI, T.; KUTARA, K.; TESHIMA, K.; EDAMURA, K.; TSUMAGARI, S.; HASEGAWA, A.; TANAKA, S. (2007) Clinical Significance of Circulating Vascular Endothelial Growth Factor in Dogs with Mammary Gland Tumors. *J Vet Med Sci* 69(1):77–80.
- KODAIRA, S. K. Física. In: CERRI, G. G.; OLIVEIRA, I. R. S. **Ultra-sonografia abdominal**. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. cap. 1, p. 1-30.
- KUMARAGURUPARAN, R.; PRATHIBA, D.; NAGINI, S. (2006). Of humans and canines: immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Res Vet Sci*, 81(2), 218-224.
- KUSEWITT, D.F. & RUSH, L.J. Neoplasia and tumor biology. In M.D. MCGAVIN & J.P. ZACHARY (Eds.), *Pathologic basis of veterinary disease*. 4rd ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2007. p. 253-298.
- LEE, C. H.; CHOI, J. W.; KIM, K. A.; SEO, T. S.; LEE, J. M.; PARK C. M. (2006) Usefulness of standard deviation on the histogram of ultrasound as a quantitative evaluate for hepatic parenchymal echotexture: preliminary study. *Ultrasound Med Biol* 32(12):1817-1826.
- LI, X.; FENG, G.S.; ZHENG, C.S.; ZHUO, C.K.; LIU, X. (2004) Expression of plasma vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma and effect of transcatheter arterial chemoembolization therapy on plasma vascular endothelial growth factor level. *World J Gastroenterol* 10(19):2878-2882.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25(4):402-408, 2001.

LUCENA, C. E. M. **Index ultrasonographic evaluation in study of solid breast nodes – proposal for a new classification.** 2006. 152 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 2006.

LUNA, M. O novo BI-RADS. Congresso Americano de Radiologia. 4ª ed. *Sociedade Brasileira de Mastologia*, dez. 2003. Disponível em: http://sbmastologia.com.br/artigos/bi_rads Acesso em: Out. 2015.

MACHADO, F.M.; NUNES, L.C.; COSTA, F.S. (2009) Ultrassonografia quantitativa do fígado em gatos com tirotoxicose induzida. *Braz J Vet Res An Sci* 46(6):438-447.

MAEDA, K.; UTSU, M.; KIHAI, P. E. (1998) Quantification of sonographic echogenicity with grey-level histogram width: A clinical tissue characterization. *Ultrasound Med Biol* 24(2):225-234.

MAIOLINO, P.; DE VICO, G.; RESTUCCI, B. (2000) Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell tumours and in squamous cell carcinomas of canine skin. *J Comp Pathol* 123(2-3):141-145.

MARTINS, M.S.; SOUZA, G.A.; DERCHAIN, S.F.M.; ROTELI-MARTINS, C.M.; TADINI, V.; SANTOS, A.L.; OLIVEIRA, S.H.C. (2002) Avaliação da resposta do câncer de mama à quimioterapia: papel da ultrassonografia e da dopplerfluxometria. *Rev Bras Ginecol Obstr* 24:447-452.

MIYAJIMA, A.; KOSAKA, T.; ASANO, T.; ASANO, T.; SETA, K.; KAWAI, T.; HAYAKAWA, M. (2002) Angiotensin II Type I Antagonist Prevents Pulmonary Metastasis of Murine Renal Cancer by Inhibiting Tumor Angiogenesis. *Cancer Res* 62: 4176-4179.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, E. Definitions and explanatory notes. WHO histological classification of mammary tumors of the dog and cat. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999, p. 18-27.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T. P. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide reference on Comparative Oncology, 1999. p. 1-59.

MISDORP, W. (2002). Tumors of the mammary gland. In D.J. Meuten (Ed.), *Tumors in domestic animals* (4rd ed.). (pp. 575-606). Iowa: Iowa State Press.

MOHAMMED, S. I.; MELONI, G. B.; PARPAGLIA, M. L.; MARRAS, V.; BURRAI, G. P.; MELONI, F.; PIRINO, S.; ANTUOFERMO, E. (2011) Mammography and ultrasound imaging of preinvasive and invasive canine spontaneous mammary cancer and their similarities to human breast cancer. *Cancer Prev Res* 4(11):1790 – 1798.

MOON, W. K.; HUANG, Y.; LO, C.; HUANG, C.; BAE, M. S.; KIM, W. H.; CHEN, J.; CHANG, R. (2015) Computer-aided diagnosis for distinguishing between triple-negative breast cancer and fibroadenomas based on ultrasound texture features. *Med Phys* 42(6):3024-3035.

MORRIS, J.S.; DOBSON, J.M.; BOSTOCK, D.E.; O'FARRELL, E. (1998) Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms. *Vet Rec* 142(24):656-658.

MORRISSON, W.B. Canine and feline mammary tumors. In: MORRISSON W.B. (Ed). *Cancer in dogs and cats – medical and surgical management*. Baltimore: Williams e Wilkins, 1998. p. 591-598.

MOULTON, J. E.; TAYLOR, D. O. N.; DORN, C. R.; ANDERSEN, A. C. (1970) Canine mammary tumors. *Pathol Vet* 7(4):289-320.

NAKAJIMA, M.; HUTCHINSON, H. G.; FUJINAGA, M.; HAYASHIDA, W.; MORISHITA, R.; ZHANG, L.; HORIUCHI, M.; PRATT, R.E.; DZAU, V. J. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer (1995) *Proc Natl Acad Sci* 92(23):10663–10667.

NASTRI, C. O.; MARTINS, W. P.; LENHARTE, R. J. (2011) Ultrassonografia no Rastreamento de Câncer de Mama. *Femina* 39(2):97-102.

NATIVIDADE, F. S.; CASTRO, M. B.; SILVA, A. S.; OLIVEIRA, L. B.; MCMANUS, C. M.; GALERA, P. D. (2014) Análise de sobrevivência e fatores prognósticos de cães com mastocitoma cutâneo. *Pesq Vet Bras* 34(9):874-884.

NOMURA, M.; YAMAGISHI, S.; HARADA, S.; HAYASHI, Y.; YAMASHIMA, T.; YAMASHITA, J.; YAMAMOTO, H. (1995) Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem* 270(47):28316–28324.

NOUET, S.; NAHMIAS, C. (2000) Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol Metab* 11(1):1–6.

NOVELLAS, R. **Vascular resistance determination with Doppler ultrasound in canine and feline**. 2007. 171 f. Tese (doutorado) – Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2007.

NYLAND, T.G.; MATTON, J. S. Ovaries and uterus. In: _____ *Small animal diagnostic ultrasound*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Company, 2002. cap. 12, p. 231-249.

NYMAN, H. T.; KRISTENSEN, A. T.; FLAGSTAD, A.; MCEVOY, F. J. (2004) A review of the sonographic assesment of tumormetastases in liver and superficial lymph nodes. *Vet Radiol Ultrasound* 45(5):438-448.

NYMAN, H. T.; KRISTENSEN, A. T.; LEE, M. H.; MARTINUSSEN, T.; MCEVOY, F. J. (2006a) Characterization of canine superficial tumors using gray-scale b mode, color flow mapping, and spectral Doppler ultrasonography-a multivariate study. *Vet Radiol Ultrasound* 47(2):192-198.

NYMAN, H.T.; NIELSEN, O.L.; MCEVOY, F.J.; LEE, M.H.; MARTINUSSEN, T.; HELLMÉN, E.; KRISTENSEN, A.T. (2006b) Comparison of B-mode and Doppler ultrasonographic findings with histologic features of benign and malignant mammary tumors in dogs. *Am J Vet Res* 67(6):985-991.

OHNUMA, Y.; TODA, M.; FUJITA, M.; HOSONO, K.; SUZUKI, T.; OGAWA, Y.; AMANO, H.; KITASATO, H.; HAYAKAWA, K.; MAJIMA, M. (2009) Blockade of an angiotensin type I receptor enhances effects of radiation on tumor growth and tumor-associated angiogenesis by reducing vascular endothelial growth factor expression. *Biomed Pharmacother* 63(2):136-45.

PATEY, D.H.; SCARFF, R.W. (1928) The position of histology in the prognosis of carcinoma of the breast. *The Lancet* 211(5460):801 -804.

PATSIKAS, M.N.; KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOY, E.; PAPAZOGLU, L.G.; PAPADOPOULOU, P.L.; TZEGAS, S.I.; TZIRIS, N.E.; KAITZIS, D.G.; DIMITRIADIS, A.S.; DESSIRIS, A.K. (2006). The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anat Histol Embryol*, 35(4), 228-234.

PAULINELLI, R.R.; REBOUÇAS, M.A.; FREITAS, JR. R. (2003) Ultrassonografia no diagnóstico do câncer de mama: realidade atual e possibilidades para o futuro. *Rev Bras Mastol* 13(4):168-174.

PAVLAKIS, K.; MESSINI, I.; VREKOUSSIS, T.; YIANNOU, P.; KERAMOPOULLOS, D.; LOUVROU, N.; LIAKAKOS, T.; STATHOPOULOS, E. N. (2008) The assessment of angiogenesis and fibroblastic stromagenesis in hyperplastic and pre-invasive breast lesions. *BMC Cancer* 8(1):88.

PAYAN-CARREIRA, R.; MARTINS-BESSA, A.C. (2008) Ultrasonographic assessment of the feline mammary gland. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 10:466-471.

PELETEIRO, M.C. (1994). Tumores mamários na cadela e na gata. *RPCV* 89(509):10-28.

PELETEIRO, C.; BRANCO, S.; CORREIA, J. Estudo epidemiológico de tumores mamários em cadela. In: C. PELETEIRO, S. BRANCO & J. CORREIA. *Libro de Actas-VIII Reunion Sociedad Española de Anatomia Patológica Veterinária (SEAPV)*, Córdoba, Espanha, 1996. p.66.

PINHO, M. S. L. (2005) Angiogênese: O gatilho proliferativo. *Rev Bras Coloproct* 25(4):396-402.

QUEIROZ, J.E.R.; GOMES, H. M. (2006) Introdução ao processamento digital de imagens. *Rev Inf Teor Apl* 13:11-42.

RAO, A. A.; FENEIS, J.; LALONDE, C.; OJEDA-FOURNIER, H. (2016) A Pictorial Review of Changes in the BI-RADS Fifth Edition. *RadioGraphics* 36(3).

REBÊLO, A. M. G. **Invasive ductal carcinoma of the breast: relationship between the immunohistochemical expression of endothelial growth factor (VEGF) and BCL-2 oncogene with tumor size and status of the sentinel nodes at the time of histopathological diagnosis of neoplasm.** 2009. 74 f. Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Brasil. 2009.

REESE, S.; BUDRAS, D-K.; MÜLLING, Chr., BRAGULLA, H, KÖNIG, H.E. Tegumento Comum: Glândula Mamária. In: KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.G. *Anatomia dos Animais Domésticos*. 4ed, Porto Alegre: Artmed, 2011 p. 639- 646.

RESTUCCI, B.; PAPPARELLA, S.; MAIOLINO, P.; VICO, G. (2002) Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 39(4):488-493.

RESTUCCI, B.; MAIOLINO, P.; PACIELLO, O.; MARTANO, M.; DE VICO, G.; PAPPARELLA, S. (2003) Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry. *J Comp Pathol* 128(4):252–259.

RESTUCCI, B.; BORZACCHIELLO, G.; MAIOLINO, P.; MARTANO, M.; PACIELLO, O.; PAPPARELLA, S. (2004) Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours. *J Comp Pathol* 130(2-3):99–104.

RIBATTI, D.; VACCA, A.; PRESTA, M. (2002) The Discovery of angiogenic factors: A historical review. *Gen Pharmacol – Vasc S* 35(5):227-231.

RIZKALLA, B.; FORBES, J. M.; COOPER, M. E.; CAO, Z. (2003) Increased renal vascular endothelial growth factor and angiopoietins by angiotensin II infusion is mediated by both AT1 and AT2 receptors. *J Am Soc Nephrol* 14(12):3061–3071.

RUBENS, D.J.; BHATT, S.; NEDELKA, S.; CULLINAN, J. (2006) Doppler artifacts and pitfalls. *Radiol Clin North Am* 44(6):805-835.

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland. In: S.J. WITHROW & E.G. MACEWEN (Eds.) *Small animal clinical oncology* 3rded Philadelphia: Saunders Elsevier, 2001. p. 455-477.

SANTOS, W. G.; NAVARRO, D. M.; BORLINI, D. C.; OLIVEIRA, D. C.; MONTEIRO, J. N. M.; TEIXEIRA, M. W.; COSTA, F, S. (2013) Ultrassonografia quantitativa do fígado e do ligamento falciforme de gatos tratados com prednisolona. *MEDVEP: Rev Cient Med Vet* 10(34):402-405.

SCHOEFFNER, D. J.; MATHENY, S. L.; AKAHANE, T.; FACTOR, V.; BERRY, A, MERLINO, G.; THORGEIRSSON, U. P. (2005) VEGF contributes to mammary tumor growth in transgenic mice through paracrine and autocrine mechanisms. *Lab Invest* 85(5):608-623.

SCHROEDER, R-J.; BOSTANJOGLO, M.; RADEMAKER, J.; MAEURER, J.; FELIX, R. (2003) Role of Power Doppler technique and ultrasound contrast enhancement in the differential diagnosis of focal breast lesions. *Eur Radiol* 13(1):68-79.

SEHGAL, C.M.; WEINSTEIN, S.P.; ARGER, P.H.; CONANT, E.E. (2006) A review of breast ultrasound. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 11(2):113-123.

SHAFIEE, R.; JAVANBAKHT, J.; ATYABI, N.; KHERADMAND, P.; KHERADMAND, D.; BAHRAMI, A.; DARAEI, H.; KHADIVAR, F. (2013) Diagnosis, Classification, and grading of canine mammary tumors as a model to study human breast cancer: an clinical- cytohitopathological study environmental factors influencing public health and medicine. *Cancer Cell Int* 13(79):79.

SILVA, L. D. M; BARBOSA, C. C.; PEREIRA, B. S. (2011) O uso da ultrassonografia Doppler na reprodução de cadelas e gatas. *Rev Bras Reprod Anim* 35(2):198-201.

SILVA E.G.; GONÇALVES, M.T.C.; PINTO, S. C. C.; SOARES, D. M.; OLIVEIRA, R.A.; ALVES, F.R.; ARAÚJO, A.V.C.; GUERRA, P.C. (2015) Quantitative analysis of testicular echogenicity by technical histogram in sheep of the western lowland region of Maranhão, Brazil. *Pesq Vet Bras* 35(3):297-303.

SIMM, R.G.R. **Avaliação ultrassonográfica de tumores mamários e linfonodos locorreginais em cadelas**. 2016. 69 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, 2016. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/143486>>.

SLEECKX, N.; ROOSTER, H.; VELDHUIS KROEZE, E. J. B.; VAN GINNEKEN, C.; VAN BRANTEGEM, L. (2011) Canine Mammary Tumours, an Overview. *Reprod Domest Anim* 46(6):1112-1131.

SORENMO, K. (2003) Canine mammary gland tumors. *Vet Clin Small Anim* 33(3):573–596.

SOUZA, P. M. **Contribuição dos exames ultrassonográficos convencional, Doppler e classificação Bi-Radis® na avaliação dos tumores mamários em cadelas.** 2012. 73 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/101096>>.

STOLL, M.; STECKELINGS, M.; PAUL, M.; BOTTARI, S.P.; METZGER, R.; UNGER, T. (1995) The angiotensin AT2 – receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells *J. Clin. Invest.* 95, 651 - 657.

STOUFFER, R. L.; MARTÍNEZ-CHEQUER, J. C.; MOLSKNESS, T. A.; XU, F.; HAZZARD, T. M. (2001) Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch Med Res* 32(6):567-575.

THURÓCZY, J.; REISVAAG, G.J.; PERGE, E.; TIBOLD, A.; SZILÁGYI, J.; BALOGH, L. (2007) Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *J Comp Pathol* 137(2-3):122-129.

TOUYZ, R.M.; SCHIFFRIN, E.L. (2000) Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52(4):639-672.

TROY, G.C.; HUCKLE, W.R.; ROSSMEISL, J.H.; PANCIERA, D.; LANZ, O.; ROBERTSON, J.L.; WARD, D. L. (2006) Endostatin and Vascular Endothelial Growth Factor Concentrations in Healthy Dogs, Dogs with Selected Neoplasia, and Dogs with Nonneoplastic Diseases. *J Vet Intern Med* 20(1):144–150.

VAIL, D.M.; MACEWEN, E.G. (2000) Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest* 18(8):781–92.

WERTHER, K.; CHRISTENSEN, I.J.; NIELSEN, H.J. (2002) Prognostic impact of matched preoperative plasma and serum VEGF in patients with primary colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 86(3):417-423.

WOOD, M.M.; ROMINE, L.E.; LEE, Y.K.; RICHMAN, K.M.; O'BOYLE, M.K.; PAZ, D.A.; CHU, P.K.; PRETORIUS, D.H. (2010) Spectral Doppler signatures waveforms in ultrasonography. *Ultrasound Q* 26 (2): 83-99.

YONEMARU, K.; SAKAI, H.; MURAKAMI, M.; YANAI, T.; MASEGI, T. (2006) Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and their receptor (Flt -1, Flk-1, and Flg-1) in canine vascular tumours. *Vet Pathol* 43(3): 971–980.

ZHANG, X.; LASSILA, M.; COOPER, M. E.; CAO, Z. (2004) Retinal expression of vascular endothelial growth factor is mediated by angiotensin type 1 and type 2 receptors. *J Am Heart Assoc* 43:276–281.

ZOTTI, A.; BANZATO, T.; GELAIN, M. E.; CENTELLEGUE, C.; VACCARO, C.; ARESU, L. (2015) Correlation of renal histopathology with renal echogenicity in dogs and cats: an ex-vivo quantitative study. *BMC Vet Res* (11):99.

APÊNDICE 1

Ficha de Identificação

Data: _____

Número de ID: _____

Solicitante: _____

Nome do Tutor: _____

Telefone: _____

E-mail: _____

Nome do Paciente: _____

Espécie: _____

Raça: _____

Idade: _____

Peso: _____

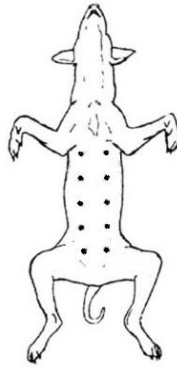
Uso prévio de contraceptivos: () NÃO () SIM Duração: _____

Castração: () NÃO () SIM Data da castração: _____

Características tumorais: _____

Evolução tumoral: _____

Mamas acometidas:



Metástase: () NÃO () SIM Localização: _____

Avaliação Hematológica:

Avaliação Histopatológica:

Observações adicionais:

Vascularização: () Ausente () Interna () Periférica

Casos Especiais

- () Cisto simples
- () Microcistos agrupados
- () Cistos complicados
- () Neoplasias cutâneas adjacentes
- () Anormalidades vasculares
- () Coleção líquida pós-cirúrgica
- () Necrose gordurosa

APÊNDICE 3

Ficha de Classificação Léxico BI-RADS Modificada

Categorias	Comentário / Conduta	Probabilidade de Malignidade
1 – Negativa	Nenhuma lesão observada / Rotina	0%
2 – Benigna	Achado sem características de malignidade / Rotina	0%
3 – Provavelmente benigna	Provavelmente benigno / Controle (6 meses)	0 a \leq 2%
4 – Suspeita de malignidade	Considerar biópsia	
✓ 4A: Baixa	Baixa probabilidade de malignidade	2 a \leq 10%
✓ 4B: Moderada	Moderada probabilidade de malignidade	10 a \leq 50%
✓ 4C: Alta	Alta probabilidade de malignidade	50 a $<$ 95%
5 – Altamente sugestiva de malignidade	Considerar biópsia / Conduta terapêutica adequada ao caso	\geq 95%
6 – Malignidade confirmada	Diagnóstico já obtido através de biópsia / Excisão cirúrgica quando apropriado	

APÊNDICE 4

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Você, tutor, está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento.

Título do Projeto: TÉCNICAS ULTRASSONOGRÁFICAS DE ANÁLISE E CATEGORIZAÇÃO DE NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA E SUA RELAÇÃO COM A ANGIOGÊNESE

Pesquisador responsável: Prof^a Dr^a Aurea Wischral

Pesquisador participante: Débora Monteiro Navarro Marques de Oliveira

Este estudo tem por objetivo determinar as características imaginológicas de neoplasias mamárias em cadelas e gatas e sua correlação com a expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e seus receptores, e receptor da angiotensina II (ANG II).

Para sua realização o paciente será submetido à tricotomia da região abdominal, contenção física para realização do exame ultrassonográfico e radiográfico, e coleta de amostras teciduais da neoplasia mamária, após o procedimento cirúrgico de retirada do tumor. É possível que aconteçam os seguintes desconfortos ou riscos: estresse pela contenção física para realização do exame ultrassonográfico/radiográfico. Destaca-se que a realização do mesmo será indolor e sem riscos a vida do paciente. Os benefícios que esperamos com o estudo são: maior compreensão sobre parâmetros ultrassonográficos e fatores angiogênicos relacionados a neoplasias mamárias em cadelas e gatas; determinação de parâmetros ultrassonográficos que possam ter aplicabilidade na rotina oncológica de animais de companhia; instituir novos critérios de diagnóstico por imagem em cadelas e gatas com neoplasia mamárias, visando favorecer o estadiamento da doença e promover melhor orientação terapêutica.

Ressalta-se que durante todo o período da pesquisa você tem o direito de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento referente ao mesmo. Você tem garantido o seu direito de não aceitar participar ou de retirar sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo. As informações desta pesquisa serão

confidencias, e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação (confidencialialidade).

Eu, (_____),
após a leitura deste documento acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais meu animal será submetido, e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar.

Diante do exposto expresso minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo:

Assinatura do voluntário ou de seu representante legal

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste voluntário (ou de seu representante legal) para a participação neste estudo:

Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE



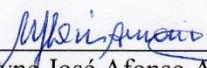
Universidade Federal Rural de Pernambuco
 Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
 Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	0095/2015
Número do processo	23082.007573/2015
Data de emissão da licença	24 de Agosto de 2015
Título do Projeto	Correlação da ultrassonografia Doppler e Histograma dos níveis de cinza com a expressão gênica de Ang II e Vegf em cadelas e gatas com neoplasia mamária.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Aurea Wischral
Colaboradores	Débora Monteiro Navarro Marques de Oliveira; Maria Albeline S. Lacerda.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Cão 20; Gato 20; total de 40 animais.


 Prof.^ª. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
 (Coordenadora da CEUA-UFRPE)



Prof.^ª Dr.^a Marleyne Amorim
 Coordenadora CEUA