



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ANORMALIDADES HEMATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E HEMOSTÁTICAS
DE ORIGEM PARANEOPLÁSICA EM FÊMEAS CANINAS COM NEOPLASIA
MAMÁRIA

Naila Cristina Blatt Duda

PORTO ALEGRE

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ANORMALIDADES HEMATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E HEMOSTÁTICAS
DE ORIGEM PARANEOPLÁSICA EM FÊMEAS CANINAS COM NEOPLASIA
MAMÁRIA**

Autor: Naila Cristina Blatt Duda

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias – UFRGS
como requisito parcial da obtenção do título de
Mestre

Orientador: Félix Hilário Diaz González

Co-orientador: Stella de Faria Valle

Porto Alegre, 2014.

CIP - Catalogação na Publicação

Duda, Naila Cristina Blatt

Anormalidades hematológicas, bioquímicas e hemostáticas de origem paraneoplásica em fêmeas caninas com neoplasia mamária / Naila Cristina Blatt Duda. -- 2014.

56 f.

Orientador: Félix Hilário Diaz González.

Coorientadora: Stella de Faria Valle.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Caninos. 2. Síndromes paraneoplásicas. 3. Neoplasia mamária. 4. Estadiamento tumoral. I. González, Félix Hilário Diaz, orient. II. Valle, Stella de Faria, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus orientadores, Prof^o Félix e Prof^a Stella, pela oportunidade, apoio e confiança.

Aos meus amigos e colegas do LACVet e do ONCOVET, por toda ajuda durante a realização desse projeto.

Aos meus pais, Nádía e Luiz, por todo amor, dedicação e incentivos a mim destinados.

Ao meu namorado Álisson, companheiro constante nessa jornada, pelo apoio, paciência e carinho.

A todos os meus familiares e amigos, que sempre estiveram torcendo por mim.

À CAPES-CNPq, pelo apoio financeiro.

Naila Cristina Blatt Duda

ANORMALIDADES HEMATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E HEMOSTÁTICAS DE
ORIGEM PARANEOPLÁSICA EM FÊMEAS CANINAS COM NEOPLASIA
MAMÁRIA.

Aprovado em 26 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Félix Hilário Diaz González - UFRGS
Orientador e Coordenador da Comissão Avaliadora

Prof^a. Dr^a. Anne dos Santos Amaral – UFSM
Membro da Comissão Avaliadora

Prof. Dr. Daniel Guimarães Gerardi –UFRGS
Membro da Comissão Avaliadora

Prof^a. Dr^a. Luciana Sonne – UFRGS
Membro da Comissão Avaliadora

ANORMALIDADES HEMATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E HEMOSTÁTICAS DE ORIGEM PARANEOPLÁSICA EM FÊMEAS CANINAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA

Autor: Naila Cristina Blatt Duda

Orientador: Félix Hilário Diaz González

Co-orientador: Stella de Faria Valle

RESUMO

As anormalidades hematológicas de origem paraneoplásica são identificadas em diversos tipos de neoplasias que acometem cães e gatos. Nas neoplasias mamárias em cadelas, já foram identificadas anormalidades relacionadas com a coagulação, onde verificou-se que a coagulação intravascular disseminada (CID) clínica e subclínica pode estar presente em 83% das cadelas com carcinoma mamário. Na medicina humana, é dada relevância à investigação de tais alterações uma vez que são fatores indicadores de prognóstico do câncer. Enquanto isso, na medicina veterinária, são escassos os estudos que relacionam as alterações hematológicas com o tipo tumoral, estadiamento e determinação de prognóstico. O objetivo do presente estudo foi realizar a avaliação hematológica, bioquímica e da hemostasia de cadelas acometidas por neoplasia mamária para identificar a alteração mais frequente, além de relacionar as anormalidades com o estadiamento tumoral. Para isso, foram utilizadas 25 cadelas atendidas pelo Grupo de Estudos em Oncologia em pequenos animais (ONCOVET) do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS (HCV-UFRGS) durante o período de 4 meses. Foi realizado coleta de sangue para hemograma, contagem de plaquetas, bioquímica sérica (albumina, ALT, cálcio, creatinina, FA, glicose, ureia) e teste de coagulação que constou de TP (tempo de protrombina), TTPa (tempo de tromboplastina parcial ativada), TT (tempo de trombina), fibrinogênio e mensuração do dímero-D. O estadiamento tumoral foi obtido através do exame físico e do resultado da biopsia das mamas. As anormalidades encontradas incluíram anemia, leucocitose neutrofílica, monocitose, eosinofilia, trombocitose, hipoalbuminemia, hipocalcemia, hipoglicemia e diminuição dos níveis de ureia sanguínea. Entretanto, essas alterações não foram relacionadas diretamente com a progressão tumoral, uma vez que não houve diferença entre os grupos avaliados. Apenas as variáveis RDW e ALT apresentaram relação significativa entre os grupos, contudo, sem relevância clínica. No teste de coagulação, houve diferença significativa entre os grupos apenas no TT e fibrinogênio, que foi relacionado com o estadiamento tumoral.

Palavras-chave: anemia; CID; hiperfibrinogenemia; neoplasia mamária; síndromes paraneoplásicas.

HEMATOLOGIC, BIOCHEMICAL AND HEMOSTATIC ABNORMALITIES OF PARANEOPLASTIC ORIGIN IN FEMALE DOGS WITH MAMMARY NEOPLASMS

Author: Naila Cristina Blatt Duda

Advisor: Félix Hilário Diaz González

Co-advisor: Stella de Faria Valle

ABSTRACT

Hematological abnormalities of paraneoplastic origin are identified in several types of cancers that affect dogs and cats. In dogs with mammary neoplasms, abnormalities associated with coagulation have been identified, and verified that disseminated intravascular coagulation (DIC) clinical and subclinical may be present in 83% of dogs with mammary carcinoma. In human medicine, research in this field has been relevant since those factors are indicators of cancer prognosis. Meanwhile, in veterinary medicine, there are few studies that relate hematological changes with tumor type, staging and determination of prognosis. The aim of this study was to evaluate the hematological, biochemical and hemostatic abnormalities in bitches affected by mammary cancer to identify the most frequent alteration and associate with tumor staging. For this, 25 bitches attended by the Oncology Study Group in small animals (ONCOVET) of the Veterinary Hospital of UFRGS (HCV-UFRGS) for the period of 4 months were used. Blood collection for complete blood count, platelet count, serum biochemistry (albumin, ALT, calcium, creatinine, ALP, glucose, urea) and coagulation test that consisted of PT (prothrombin time), aPTT (activated partial thromboplastin time), TT (thrombin time), fibrinogen and D-dimer measurement were performed. Tumor staging was obtained by physical examination and the results of the biopsy of the breast. The abnormalities found included anemia, neutrophilic leukocytosis, monocytosis, eosinophilia, thrombocytosis, hypoalbuminemia, hypocalcemia, hypoglycemia and decreased levels of urea. However, these changes were not associated directly with tumor progression, since there was no difference among the groups. Only the RDW and ALT variables was associated significantly between the groups, however, with no clinical relevance. In the coagulation test, there was significant difference between the groups only in TT and fibrinogen, which was associated with tumor staging.

Keywords: anemia; DIC; hyperfibrinogenemia; mammary neoplasm; paraneoplastic syndromes.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1. Boxplot do RDW, conforme o estadiamento tumoral. A parte superior e inferior da caixa indicam o quartil superior e inferior, respectivamente; a linha horizontal representa o valor da mediana e a linha vertical se estende do valor mínimo até valor máximo; os círculos representam os valores outliers. Significância obtida pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0.015$).....26

Figura 2. Boxplot do ALT conforme o estadiamento tumoral. A parte superior e inferior da caixa indicam o quartil superior e inferior, respectivamente; a linha horizontal representa o valor da mediana e a linha vertical se estende do valor mínimo até valor máximo; o círculo e o asterisco representam os valores outliers. Significância obtida pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0.047$).....26

ARTIGO 2

Figura 1. Boxplot do TP, TT e fibrinogênio, conforme o estadiamento tumoral em comparação com o grupo controle. A parte superior e inferior da caixa indicam o quartil superior e inferior, respectivamente; a linha horizontal representa o valor da mediana e a linha vertical se estende do valor mínimo até valor máximo; o círculo e o asterisco representam os valores outliers . Significância obtida pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0.036$; $p=0.003$ e $p=0.003$, respectivamente).....42

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1. Dados do hemograma em cadelas com neoplasia mamária (n=25) de acordo com o estadiamento tumoral.....24

Tabela 2. Dados da avaliação bioquímica em cadelas com neoplasia mamária (n=25) de acordo com o estadiamento tumoral.....25

ARTIGO 2

Tabela 1. Dados da avaliação hemostática de cadelas com neoplasia mamária (n=25) de acordo com o estadiamento tumoral.....41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
2.1 GERAL	2
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1 SÍNDROME PARANEOPLÁSICA	3
3.1.1 SÍNDROME PARANEOPLÁSICA NAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS.....	3
3.1.2 ANORMALIDADES HEMATOLÓGICAS DE ORIGEM PARANEOPLÁSICA	4
3.1.3 ANORMALIDADES BIOQUÍMICAS.....	5
3.3 COAGULAÇÃO INTRAVASCULAR DISSEMINADA	6
3.4 HEMOSTASIA	7
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
5 RESULTADOS	10
5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1	10
5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	27
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

As síndromes paraneoplásicas (SPNs) são consideradas um grupo heterogêneo de alterações clínicas que ocorrem em sítios distantes dos tumores primários ou de suas metástases. Os mecanismos e a incidência das SPNs são mais conhecidos na medicina humana. Na medicina veterinária existem poucos dados relativos a real incidência em cães, e a importância da investigação justifica-se pelo fato que as SPNs podem resultar em uma morbidade superior a do próprio tumor que as origina.

As manifestações clínicas e laboratoriais podem ser atribuídas aos efeitos dos diversos tipos de tumores em cães e gatos. Dentre as anormalidades hematológicas a anemia, eritrocitose, leucocitose neutrofílica, trombocitopenias, coagulopatias e coagulação intravascular disseminada (CID) são as mais comuns e merecem atenção no momento do diagnóstico.

Enquanto na medicina humana as alterações hematológicas nas neoplasias são consideradas como um importante fator determinante do prognóstico, na medicina veterinária, pelo fato de não haver informações suficientes, as avaliações hematológicas e, principalmente, da coagulação não são acrescentadas nos protocolos de avaliação pré-cirúrgica dos pacientes oncológicos.

Em cadelas acometidas por neoplasia mamária, as anormalidades laboratoriais relacionadas à coagulação já foram identificadas e descritas em alguns estudos, porém até o presente momento ainda são pouco exploradas no sentido da fisiopatologia, relação com os tipos histológicos e a importância para o prognóstico da doença.

A importância da determinação dos parâmetros hemostáticos é fundamentada pela coagulação intravascular disseminada (CID) ser muitas vezes, silenciosa, podendo passar despercebida nas avaliações laboratoriais. Em decorrência, os exames laboratoriais são fundamentais para determinar o prognóstico da doença neoplásica e providenciar o tratamento da síndrome e outras anormalidades previamente à instituição do tratamento clínico e cirúrgico desse tipo de paciente.

O presente estudo justifica-se pela escassez de estudos identificando as anormalidades hematológicas, bioquímicas e hemostáticas de origem paraneoplásica em cadelas com tumores de mama e relacionando-as com o estadiamento tumoral.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar as anormalidades hematológicas, bioquímicas e de hemostasia sugestivas de síndrome paraneoplásica em cadelas com neoplasias mamárias e relacionar as alterações com o estadiamento tumoral.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Síndrome paraneoplásica

As síndromes paraneoplásicas (SPNs) são consideradas um grupo heterogêneo de alterações clínicas que ocorrem em sítios distantes dos tumores primários ou de suas metástases. Em cães não se sabe ao certo a incidência da síndrome, mas em humanos estima-se que 75% dos pacientes com câncer são acometidos (MORRISON, 2002). A fisiopatologia da maioria das SPNs é variável e pouco compreendida para algumas neoplasias primárias, entretanto, na maioria das vezes está associada à liberação de fatores, hormônios, substâncias bioativas, complexos imunes, citocinas ou fatores de crescimento e que causam efeitos em diversos sítios orgânicos (THOMAS & SCHWARTZ, 2005; BERGMAN, 2013). Os mecanismos e a incidência das SPNs são mais conhecidos na medicina humana (BERGMAN, 2007), o que sugere a realização de mais estudos na medicina veterinária, pois a incidência de neoplasias em cães vem aumentando ao longo dos anos. A importância da investigação também está relacionada ao fato que a morbidade das SPNs muitas vezes é maior que do próprio tumor que as origina.

As manifestações clínicas e laboratoriais das SPNs podem ser atribuídas aos diversos tipos de tumores em cães e gatos. As mais comuns são as endócrinas e as hematológicas. Nestas últimas, a anemia e as coagulopatias são verificadas com maior frequência em cães com tumor de mastócitos, tumores de mama, hemangiossarcomas e carcinomas inflamatórios, entre outros (BERGMAN, 2007).

Dentre as anormalidades hematológicas podemos citar a anemia, eritrocitose, leucocitose neutrofílica, trombocitopenias, coagulopatias e coagulação intravascular disseminada (CID) e dentre as endócrinas, a hipercalcemia e a hipoglicemia (BERGMAN, 2013).

3.1.1 Síndrome paraneoplásica nas neoplasias mamárias

Nas fêmeas caninas, as neoplasias mamárias correspondem a aproximadamente 50% dos tumores e são mais comuns em fêmeas de meia idade sem predisposição racial (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Mais de 60% dos tumores são malignos com metástases em 25% dos casos (De NARDI, 2009). A origem das SPNs nesse tipo de tumor ainda é pouco esclarecida, porém, sabe-se que as manifestações mais comumente observadas são anemia,

leucocitose, trombocitopenias, coagulopatias e CID (STOCKHAUS *et al.*, 1999; BERGMAN, 2007).

Em um estudo no qual se verificou a relação entre as anormalidades na coagulação e alguns aspectos do carcinoma mamário em cães, pode-se identificar que 67% (40/60) das fêmeas avaliadas possuíam algum tipo de anormalidade nos testes de coagulação. Tais alterações foram correlacionadas com a progressão tumoral que foram mais evidentes nos estádios III e IV (STOCKHAUS *et al.*, 1999). As informações demonstram a importância da verificação dos parâmetros nesses pacientes com objetivo de identificar, determinar o prognóstico e providenciar o tratamento da síndrome previamente aos demais procedimentos terapêuticos. A evidência de anormalidades da coagulação de origem paraneoplásica em pacientes com neoplasia mamária pode evoluir para complicações hemorrágicas durante o tratamento (MANGIERI, 2009).

3.1.2 Anormalidades hematológicas de origem paraneoplásica

A anemia é uma manifestação paraneoplásica mais comumente verificada em cães e gatos, e a sua etiologia pode estar relacionada a doença crônica, hemólise (imunomediada ou microangiopática) e perda de sangue por sequestro celular. Nos pacientes oncológicos não tratados com quimioterápicos pode também ocorrer distúrbios no metabolismo do ferro, redução da meia vida eritrocitária e diminuição da resposta da medula óssea (BERGMAN, 2013).

O mecanismo dessa alteração está associada à secreção tumoral de citocinas como a IL-1 (interleucina 1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) responsáveis por promover sequestro de ferro, ocasionar a redução da meia vida das hemácias (IL-1) e da secreção de eritropoietina (TNF e IL-6). No caso das anemias hemolíticas, a microangiopática e a imunomediada por formação de imunocomplexos são relatadas nas neoplasias mamárias, como o carcinoma em cadelas (MANGIERI, 2009).

O aumento no número de neutrófilos circulantes tem sido associado a uma variedade de neoplasias em humanos e cães (BERGMAN, 2013). No caso da leucocitose neutrofílica, sugere-se que haja uma estimulação do fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos, pela inflamação crônica ou necrose ocasionadas pelo processo neoplásico (SHARKEY *et al.*, 1996; CHILDRESS, 2012).

A trombocitopenia é secundária ao tratamento quimioterápico e na ausência da ação dessas drogas, os mecanismos incluem o aumento da destruição, sequestro/consumo de plaquetas ou redução da produção (BERGMAN, 2007).

A trombocitose é considerada como sendo rara na oncologia veterinária, enquanto que em pacientes humanos com câncer é frequentemente observada (DeSANCHO & RAND, 2010; BERGMAN, 2013). Isso pode significar que a verdadeira incidência de trombocitose nos animais com neoplasia pode estar sendo subnotificada (CHILDRESS, 2012). Quanto à etiologia, a trombocitose pode ser classificada em fisiológica, reativa ou neoplásica (STOKOL, 2010). A fisiológica resulta de contração esplênica por influência da adrenalina e a reativa ocorre em resposta as citocinas inflamatórias ou fatores de crescimento hematopoiéticos, sendo que ambas podem ocorrer em pacientes com câncer (CHILDRESS, 2012).

Outras alterações hematológicas observadas incluem a monocitose, que pode ocorrer na inflamação tumoral ou necrose tecidual e a eosinofilia, que geralmente é incomum nos pacientes veterinários, sendo observada com mais frequência em cães e gatos com mastocitoma e linfoma, sendo de rara ocorrência em pacientes com tumores sólidos (CHILDRESS, 2012).

3.1.3 Anormalidades bioquímicas

Diversas anormalidades bioquímicas foram descritas nos pacientes oncológicos, como hipercalcemia, hipoglicemia, hipoproteinemia e elevação da fosfatase alcalina total e de suas isoenzimas correspondentes (HAMILTON *et al.*, 1973; KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2006; BERGMAN, 2013). A hipercalcemia e a hiperglicemia também podem ser observadas, mas são consideradas extremamente raras (BERMAN, 2013).

A hipoproteinemia como síndrome paraneoplásica pode ocorrer devido à síntese deficiente e/ou aumento da perda pelo trato gastrointestinal (enteropatia) ou urina (BERGMAN, 2013).

A hipercalcemia em cães tem sido relatada em diversos tipos de neoplasias, incluindo os carcinomas e adenocarcinoma mamários, embora seja observada mais comumente nos linfomas (BERGMAN, 2013). Nos processos neoplásicos, resulta da produção de substâncias tumorais como a proteína semelhante ao paratormônio (PTHrP) (KUBOTA *et al.*, 2002), que estimulam a hipercalcemia através da mobilização óssea e a reabsorção renal do cálcio. A hipercalcemia pode provocar nefropatia com consequente poliúria, polidipsia e sinais da

síndrome urêmica (WELLER & HOFFMAN, 1992; WELLER *et al.*, 1992) e está associada à maior morbidade de todas as síndromes paraneoplásicas (CARDOSO *et al.*, 2004).

De acordo com Bergman (2013), a principal causa de hipoglicemia induzida pelo câncer em cães é o insulínoma, embora já tenha sido descrita também em outros processos neoplásicos, incluindo os tumores mamários. Esse autor cita ainda que a hipoglicemia nos tumores extra-hepáticos tem sido associada com baixos níveis de insulina, enquanto que os insulínomas causam hipoglicemia pelos níveis excessivos de insulina circulante.

A elevação significativa da fosfatase alcalina relacionada aos tumores mamários caninos já foi descrita (HAMILTON *e. al.*, 1973; KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2006), além do aumento de suas isoenzimas correspondentes - hepática, óssea e induzida por corticosteroides (KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2006).

3.3 Coagulação intravascular disseminada

A coagulação intravascular disseminada (CID) desenvolve-se em decorrência da geração excessiva de proteases responsáveis pela formação de fibrina e desenvolvimento da fibrinólise em associação com falhas nos mecanismos inibitórios produzindo um estado de hipercoagulabilidade descontrolada com a formação de trombos. De uma maneira geral, a CID tem uma fase de hipercoagulabilidade seguida de uma fase hemorrágica (LEVI & CATE, 1999; MANGIERI, 2009).

O mecanismo da fibrinólise ou trombose induzida por neoplasias envolve a produção celular de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 que induz a formação do fator tecidual (tromboplastina), a expressão do PAI-1 (inibidor ativador do plasminogênio) e menor expressão da trombomodulina. Os tumores também liberam fator de crescimento do endotélio vascular que induz a expressão de fator tecidual pelos macrófagos em resposta a antígenos neoplásicos aumentando a permeabilidade microvascular e promovendo a angiogênese tumoral (MANGIERI, 2009; HACKNER & SCHAER, 2010).

A incidência da CID em cães com neoplasias malignas é de aproximadamente 10% e uma variedade de tumores podem ser associados a essa síndrome. O hemangiossarcoma é o mais comum embora os tumores inflamatórios da glândula mamária, os carcinomas de tireóide, os tumores mamários pulmonares e os carcinomas intra-abdominais também possam estar associados (BERGMAN, 2007).

Na oncologia veterinária, não há investigação da síndrome e a maior parte dos pacientes demora em apresentar um quadro de hemorragia espontânea e por esse motivo, tem-

se a importância de investigar rotineiramente (MANGIERI, 2009). O diagnóstico pode ser identificado através dos testes que avaliam a coagulação onde a trombocitopenia, prolongamento do tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) ou tempo de trombina (TT), elevação dos produtos de degradação da fibrina (PDFs) e diminuição dos níveis de fibrinogênio plasmático são comumente identificados (STOCKHAUS *et al.*, 1999; STOKOL *et al.*, 1999; BROOKS & LAFORCADE, 2010). Sugere-se que a redução da antitrombina III no soro parece ser um dos fatores de prognóstico mais valioso na presença da CID (STOKOL *et al.*, 1999). Adicionalmente, a determinação do Dímero D plasmático, um dos PDFs, tem sido considerada um dos melhores marcadores moleculares para se entender o mecanismo de ativação de procoagulantes e a CID (MACHIDA *et al.*, 2010; BROOKS & LAFORCADE, 2010). No entanto, na medicina veterinária, os testes para determinação desse parâmetro estão pouco explorados e ainda não padronizados para o uso na rotina laboratorial.

3.4 Hemostasia

Hemostasia é o mecanismo que previne a perda de sangue através de injúrias no sistema vascular envolvendo interações entre o endotélio vascular, plaquetas, fatores de coagulação e mecanismos fibrinolíticos. A avaliação laboratorial consiste basicamente na verificação da plaquetometria, tempo de sangramento, tempo de coagulação ativado, TP, TTPa, TT, fibrinogênio plasmático, verificação de PDFs (BAKER, 2007), além da determinação do Dímero D plasmático (MACHIDA *et al.*, 2010) e da tromboelastografia (HACKNER & SCHAER, 2010).

O TTPa é utilizado para o monitoramento das vias intrínseca (fatores XII, XI, IX e VIII) e comum (fatores X, V, II e I) da coagulação (BAKER, 2010) e podem apresentar tempos prolongados em pacientes com ou sem sintomatologia clínica da CID (STOKOL *et al.*, 1999). O TP avalia a via extrínseca (fator VII) e a via comum. Em ambos os casos, o prolongamento do tempo de formação do coágulo *in vitro* indica que ocorreu redução de aproximadamente 70% da atividade de algum fator (STOCKHAM & SCOTT, 2011).

A hemostasia anormal causa hemorragia ou trombose sendo que os exames laboratoriais dos componentes do sistema hemostático servem para detectar, explicar, monitorar ou prognosticar os estados patológicos (STOCKHAM & SCOTT, 2011).

Para o diagnóstico da CID são considerados pelo menos três alterações das seguintes: trombocitopenia; prolongamento de TP, TTPa, TT, hipofibrinogenia e elevação dos valores de

PDF e Dímero D (STOCKHAUS *et al.*, 1999; STOKOL *et al.*, 1999; BROOKS & LAFORCADE, 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos serão descritos nos artigos científicos que serão submetidos em periódico da área. Os artigos em questão estão formatados de acordo com as normas para envio do periódico *Veterinary Clinical Pathology*.

5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em forma de artigos científicos que serão submetidos em periódico da área. Os artigos em questão estão formatados de acordo com as normas para envio do periódico *Veterinary Clinical Pathology*.

5.1 Artigo científico 01

Anormalidades hematológicas e bioquímicas de origem paraneoplásica em fêmeas caninas com neoplasia mamária

Hematologic abnormalities of paraneoplastic origin in female dogs with mammary neoplasms

Naila C. B. Duda¹, Luciane C. Vieira², Luciana O. de Oliveira², Juliana P. Matheus¹, Natália C. Angeli¹, Nilson J. da S. Nunes¹, Stella de F. Valle¹, Félix H. D. González¹

¹Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVet) e ²Serviço de Oncologia Veterinária (ONCOVET), Hospital de Clínicas Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Endereço para correspondência: Naila C. B. Duda, LACVet, Hospital de Clínicas Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, 91540-000, Porto Alegre, Brasil. E-mail: ncbduda@hotmail.com

1 **RESUMO**

2 **Background:** As anormalidades hematológicas e endócrinas de origem paraneoplásica tem
3 sido associadas a diversos tipos de neoplasias em cães e gatos. Ao contrário da medicina
4 humana, existem poucos dados relativos a incidência das síndromes paraneoplásicas (SPNs)
5 em cães, o que justifica a necessidade de uma maior investigação, pois apresentam uma
6 elevada morbidade e podem ser fieis indicadores de prognóstico. Anormalidades como
7 anemia, leucocitose, trombocitopenias, coagulopatias e coagulação intravascular disseminada
8 (CID) já foram relatadas em cadelas com tumores mamários.

9 **Objetivo:** O objetivo desse estudo foi realizar a avaliação hematológica e bioquímica de
10 cadelas acometidas por neoplasia mamária com a finalidade de identificar as alterações mais
11 comuns e relacionar com o estadiamento tumoral.

12 **Métodos:** Amostras de sangue de 25 cadelas acometidas por neoplasia mamária foram
13 coletadas para hemograma e bioquímica sérica (albumina, ALT, cálcio, creatinina, FA,
14 glicose e ureia). Os animais foram divididos em cinco grupos conforme o estadiamento
15 tumoral adaptado para os tumores de mama em cães (TNM – I a V). As variáveis
16 hematológicas e bioquímicas foram comparadas entre os grupos.

17 **Resultados:** No hemograma foi observado leucocitose neutrofílica (44%), anemia (24%),
18 monocitose (24%) e eosinofilia (24%); e na bioquímica sérica, hipocalcemia (76%),
19 diminuição dos níveis de ureia sanguínea (40%), hipoalbuminemia (32%) e hipoglicemia
20 (8%). Entre os grupos conforme o estadiamento tumoral, não foi verificada associação em
21 todos os parâmetros estudados. Apenas as variáveis RDW e ALT apresentaram relação
22 significativa entre os grupos.

23 **Conclusões:** Embora os achados sanguíneos não tenham sido relacionados diretamente com o
24 estadiamento tumoral, as alterações encontradas sugerem a necessidade de novas

25 investigações quanto ao mecanismo das alterações, uma vez que podem influenciar na
26 condição clínica e no prognóstico desses indivíduos.

27

28 **Palavras-chave:** caninos; estadiamento tumoral; glândula mamária; neoplasia.

29

30 **INTRODUÇÃO**

31 As síndromes paraneoplásicas (SPNs) são consideradas um grupo heterogêneo de
32 alterações clínicas que ocorrem em sítios distantes dos tumores primários ou de suas
33 metástases.¹ A fisiopatologia da maioria das SPNs é variável e pouco compreendida para
34 algumas neoplasias primárias, entretanto, na maioria das vezes está associada à liberação de
35 fatores, hormônios, substâncias bioativas, complexos imunes, citocinas ou fatores de
36 crescimento e que causam efeitos em diversos sítios orgânicos.¹ Os mecanismos e a
37 incidência das SPNs são mais conhecidos na medicina humana², onde se estima que 75% dos
38 pacientes com câncer sejam acometidos pela síndrome.³ Na medicina veterinária existem
39 poucos dados relativos a real incidência em cães, e a importância da investigação justifica-se
40 pelo fato que as SPNs podem resultar em uma morbidade superior a do próprio tumor que as
41 origina.¹

42 As manifestações clínicas e laboratoriais das SPNs podem ser atribuídas aos efeitos
43 dos diversos tipos de tumores em cães e gatos.¹ Dentre as anormalidades hematológicas a
44 anemia, eritrocitose, leucocitose neutrofílica, trombocitopenias, coagulopatias e coagulação
45 intravascular disseminada (CID) são as mais comuns¹ e merecem atenção no momento do
46 diagnóstico.

47 A anemia é a manifestação paraneoplásica mais comum no paciente com câncer e a
48 sua etiologia pode estar relacionada a doença crônica, hemólise (imunomediada ou
49 microangiopática) e perda de sangue por sequestro celular. Em pacientes não tratados com

50 quimioterápicos pode também ocorrer distúrbios no metabolismo do ferro, redução da meia-
51 vida eritrocitária e diminuição da resposta da medula óssea.¹

52 Além da anemia, o aumento no número de neutrófilos circulantes pode ocorrer por
53 uma provável secreção do fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos, em
54 resposta a inflamação crônica ou necrose ocasionadas pelo processo neoplásico.⁴⁻⁵

55 Os escassos estudos em animais não tratados sugerem uma investigação das alterações
56 nos parâmetros hematológicos e bioquímicos em pacientes com câncer para que se estabeleça
57 e se conheça as anormalidades ocorrentes para que a síndrome seja controlada previamente
58 aos demais procedimentos terapêuticos. A partir disso, objetiva-se com o presente trabalho, a
59 identificação das alterações hematológicas e bioquímicas mais frequentes e a associação das
60 anormalidades com o estadiamento tumoral, conforme a classificação TNM modificada para
61 os tumores mamários caninos.⁶

62

63 **MATERIAIS E MÉTODOS**

64 **Seleção dos animais e coleta das amostras**

65 O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade
66 Federal do Rio Grande do Sul (processo nº 23774 - CEUA/UFRGS). O uso dos animais foi
67 autorizado pelos tutores através da leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e
68 Esclarecido no qual constava os tipos de procedimentos e os riscos conforme a Diretriz
69 Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos.⁷ Foram
70 amostradas 37 fêmeas caninas de diversas raças acometidas por neoplasia mamária, atendidas
71 no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS (HCV-UFRGS) durante um período de
72 quatro meses. Todos os animais foram submetidos a um exame clínico geral e específico da
73 glândula mamária, associado à investigação de metástases torácica e abdominal por meio de
74 exames de imagem (estudo radiográfico torácico e ultrassonografia abdominal). Com objetivo

75 de excluir processos inflamatórios e hiperplásicos das glândulas mamárias, as pacientes foram
76 submetidas a citopatologia aspirativa com agulha fina (CAAF) das glândulas afetadas.

77 Após a avaliação clínica foram coletadas amostras de sangue por punção venosa a
78 vácuo, após antissepsia adequada do local, com auxílio de agulha 21G na seguinte ordem: 4
79 mL em tubos secos para as provas bioquímicas e 3 mL em tubos com anticoagulante
80 etilenodiaminotetracético dipotássico (EDTA-K₂) para hemograma.

81 Animais que apresentavam doenças concomitantes que pudessem interferir na
82 avaliação hematológica e bioquímica, como outros tipos de neoplasias, falência de algum
83 órgão e hepatopatias, foram descartados do estudo. Apenas as cadelas que estavam
84 clinicamente aptas e que obedeceram às diretrizes do estudo foram encaminhadas para o
85 procedimento cirúrgico conforme a indicação clínica.

86

87 **Hematologia e bioquímica**

88 Para o hemograma, a contagem total de eritrócitos, leucócitos, a determinação da
89 hemoglobina e a média da distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW), foram realizadas
90 em um contador automático (ABC Vet, ABX Micros, Horiba). O hematócrito foi determinado
91 pelo método de microhematócrito a 9520 g por cinco minutos e os índices volume corpuscular
92 médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados.
93 A contagem diferencial e a análise do esfregaço sanguíneo corado foram feitos através de
94 microscopia óptica pelo mesmo observador. A contagem de reticulócitos e a correção do valor
95 total foram realizados apenas nos animais que apresentavam hematócrito inferior a 37%.

96 A amostra de sangue sem anticoagulante foi destinada à análise bioquímica. Após a
97 retração do coágulo por 30 minutos, realizou-se a centrifugação a 2000 g por 10 minutos para
98 obtenção do soro. As análises foram realizadas em duplicata, e foram obtidos os valores
99 médios de albumina, alanina transaminase (ALT), cálcio total, creatinina, fosfatase alcalina

100 (FA), glicose e ureia por método colorimétrico enzimático (Labtest Diagnostica, Lagoa Santa,
101 MG) em espectrofotômetro automático (CM 200, Wiener Lab Group, Argentina).

102

103 **Estadiamento tumoral**

104 Para o procedimento cirúrgico, as pacientes foram submetidas a anestesia geral
105 (inalatória) e analgesia de acordo com o estado clínico e a classificação sugerida pela ASA
106 (Associação Americana de Anestesiologia). Durante o procedimento de mastectomia, as
107 mamas removidas juntamente com os linfonodos regionais foram coletados e fixados em
108 formol tamponado a 10% e encaminhados ao Setor de Patologia Veterinária da UFRGS para
109 avaliação histopatológica e confirmação da origem tumoral, necessários para o estadiamento
110 tumoral e classificação através do sistema TNM para tumores mamários caninos⁶ adaptado a
111 partir da classificação proposta para humanos.⁸ A classificação aplicada é baseada em 5
112 estádios (I a V) determinados através da avaliação do tamanho do tumor primário (T),
113 acometimento de linfonodos regionais (N) e presença ou ausência de metástases à distância
114 (M). Essa proposta modificada da versão original determina a classificação dos estádios I, II e
115 III conforme o tamanho tumoral: I, menor que 3 cm; II, entre 3 e 5 cm; e III, maior que 5 cm.
116 Metástase em linfonodos regionais representa o estágio IV, independente do tamanho do
117 tumor e metástase à distância constitui o estágio V.^{6,9}

118

119 **Análise estatística**

120 Foram descritas as variáveis pela mediana, média, valor mínimo e valor máximo, e
121 foram comparadas entre os grupos conforme o estadiamento tumoral pela classificação TNM
122 através do teste de Kruskal-Wallis. Em caso de diferença significativa foram ordenadas as
123 variáveis por postos e comparadas entre os grupos pelo teste post-hoc de Tukey utilizando o
124 programa SPSS v 18.0. Considerou-se um nível de significância de 5%.

125

126 **RESULTADOS**

127 Um total de 25 animais dos 37 amostrados foram considerados aptos e incluídos no
128 estudo. A idade média dos animais amostrados, representadas por diversas raças, foi de 9,72
129 anos (6 a 14 anos). A avaliação histológica dos tumores mamários dos 25 animais permitiu
130 classificar as neoplasias em grupos: carcinoma *in situ* (n=2 – 8%), carcinoma complexo (n=4
131 – 16%), carcinoma simples (n=8 – 32%), grupo composto por carcinoma tubulopapilar (n=4 –
132 12%), carcinoma sólido (n=2 – 8%) e carcinoma anaplásico (n=2 – 8%), sarcoma (n=1 – 4%)
133 representado por osteossarcoma de origem mioepitelial de mama, carcinosarcoma (n=6 –
134 24%), mioepitelioma (n=1 – 4%), carcinoma em tumor misto (n=2 – 8%) e tumor misto
135 benigno (n=1 – 4%). A partir dessa classificação realizou-se o estadiamento tumoral,
136 conforme o sistema TNM adaptado para tumores mamários caninos, distribuindo-se os 25
137 animais nos cinco grupos: estágio I (n=6), estágio II (n=5), estágio III (n=8), estágio IV (n=4)
138 e estágio V (n=2).

139 Das variáveis hematológicas (Tabela 1), apenas o RDW apresentou diferença
140 significativa entre os grupos ($p=0.015$; Figura 1), evidenciada entre os grupos I e III
141 ($p=0.007$) e entre os grupos II e III ($p=0.026$). No eritrograma, 24% dos indivíduos (n=6)
142 apresentaram valores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito abaixo dos valores de
143 referência para a espécie, caracterizando anemia. No leucograma, 44% dos animais
144 amostrados (n=11), pertencentes aos grupos II, III, IV e V apresentaram leucocitose
145 neutrofílica, 24% (n=6) apresentaram monocitose e 24% (n=6) eosinofilia.

146 Nas variáveis bioquímicas (Tabela 2), verificou-se diferença significativa para ALT
147 ($p=0.028$; Figura 2) entre os grupos avaliados, evidenciada entre os grupos I e II ($p=0.047$) e
148 entre os grupos I e IV ($p=0.010$), sendo que o valor mediano e a média do grupo I foram
149 superiores aos demais. A hipoalbuminemia foi constatada em 32% das fêmeas (n=8),

150 pertencentes aos grupos I (n=1), II (n=1), III (n=4) e IV (n=2). O valor mediano e média do
151 cálcio sérico foram abaixo dos valores de referência (9-11.3 mg/dL), indicando hipocalcemia
152 em 19 animais (76%). Com relação a ureia, o grupo III apresentou valor mediano inferior ao
153 valor de referência para a espécie. No total, 40% das fêmeas (n=10) apresentaram diminuição
154 dos valores de ureia sanguínea.

155

156 **DISCUSSÃO**

157 O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações hematológicas em cadelas
158 com tumor de mama e relacionar com o estadiamento tumoral conforme a classificação
159 recentemente proposta para essa neoplasia. Esse trabalho vem a colaborar com a determinação
160 inicial dos achados hematológicos e dos demais exames laboratoriais em cães acometidos por
161 doenças neoplásicas para no futuro, através de outros estudos, relacionar o prognóstico e a
162 sobrevida de pacientes não tratados com as alterações laboratoriais.

163 Das 25 cadelas avaliadas, em seis (24%) pode-se observar uma anemia normocítica
164 normocrômica arregenerativa, discreta a moderada condizendo com estudos anteriores que
165 referem a anemia como a manifestação paraneoplásica frequentemente diagnosticada em
166 cães.^{1,10-11} Nesses casos, a etiologia pode estar relacionada à doença crônica, hemólise, perda
167 de sangue por sequestro celular, distúrbios no metabolismo do ferro, redução da meia-vida
168 eritrocitária e diminuição da resposta da medula óssea.^{1,12} Em pacientes com câncer, o
169 mecanismo dessa alteração está associada à secreção tumoral de citocinas como a IL-1
170 (interleucina 1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) responsáveis por promover
171 sequestro de ferro, redução da meia-vida das hemácias (IL-1) e redução da secreção de
172 eritropoietina (TNF e IL-6). As anemias hemolíticas, como a microangiopática e a
173 imunomediada por formação de imunocomplexos já foram descritas em cadelas com
174 carcinoma mamário.¹³ Acredita-se que a causa mais importante de anemia não regenerativa

175 em pacientes com câncer seja a anemia da doença inflamatória, comumente referida como
176 anemia da doença crônica, sendo caracterizada por uma inadequada produção de
177 eritropoietina, diminuição da resposta das células progenitoras na medula óssea à
178 eritropoietina, redução da meia-vida eritrocitária e distúrbios no metabolismo do ferro.⁵
179 Hipotetizando que a secreção de fatores pelo tumor fosse maior nos estádios mais avançados
180 da doença, esperava-se que os animais pertencentes ao grupo V apresentassem anemia, e o
181 fato de não ter sido observado pode ser atribuído ao reduzido número de indivíduos nesse
182 grupo (n=2).

183 A amplitude de distribuição do tamanho dos eritrócitos, denominado de RDW (Red
184 Blood Cell Distribution Width) reflete o grau de heterogeneidade entre as hemácias,¹⁴ sendo
185 importante na classificação das anemias.¹⁵ Os valores de mediana e média dos grupos
186 avaliados permaneceu dentro dos valores de referência (14-17%), entretanto dez indivíduos
187 (40%) apresentaram valores de RDW inferiores a 14% e um indivíduo (4%) apresentou valor
188 de RDW discretamente superior ao valor de referência (17,1%). Valores diminuídos de RDW
189 não apresentam relevância clínica, enquanto que os valores elevados indicam uma população
190 eritrocitária heterogênea,¹⁶ que pode ser observada nas anemias regenerativas, em condições
191 que a produção de eritrócitos é inefetiva ou após transfusão sanguínea.¹⁵

192 A leucocitose neutrofílica observada em onze indivíduos (44%) pode ser atribuível à
193 inflamação ou necrose tecidual associados com câncer, ou ainda, ocasionada ao estresse.⁵
194 Sugere-se que nos casos de malignidade, onde o mecanismo ainda não está totalmente
195 esclarecido, pode ocorrer um aumento das concentrações dos fatores de crescimento
196 hematopoiéticos na circulação, ocasionando aumento da produção e liberação de neutrófilos.
197 Além disso, as citocinas inflamatórias IL-1 e TNF- α também podem induzir neutrofilia por
198 estimulação da produção de fatores de crescimento.¹⁷ Dos onze animais que apresentaram
199 leucocitose neutrofílica, seis (24%) tinham monocitose associada, o que reforça, nesse caso, a

200 existência de uma inflamação crônica, tumoral ou necrose tecidual⁵ nas cadelas com
201 neoplasias mamárias.

202 A eosinofilia paraneoplásica é observada com mais frequência em cães e gatos com
203 mastocitoma e linfoma e de rara ocorrência em pacientes com tumores sólidos,⁵ embora tenha
204 sido relatada em cães com fibrossarcoma oral¹⁸ e carcinoma mamário anaplásico.¹⁹ Uma das
205 fêmeas obteve o diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma tubulopapilar com áreas de
206 carcinoma anaplásico condizendo com o observado em um relato de caso previamente
207 publicado.¹⁹ No estudo, a eosinofilia observada em 24% (n=6) dos animais pode sugerir a
208 síndrome, no entanto, o mecanismo ainda é desconhecido e requer uma investigação mais
209 aprofundada sobre a interferência de outras citocinas secretadas especificamente em alguns
210 tipos tumorais, que não o TNF- α , IL-1 e IL-6, como a IL-5, uma das citocinas envolvida na
211 produção de eosinófilos.²⁰

212 A albumina é uma proteína de fase aguda negativa, que tende a diminuir sua
213 concentração sérica após um estímulo inflamatório,²¹ devido à inibição da sua síntese pelas
214 citocinas pró-inflamatórias²² e ao aumento da permeabilidade vascular, com consequente
215 saída para os espaços extravasculares.²³ Dos 32% (n=8) dos animais que apresentaram
216 hipoalbuminemia, quatro (16%) apresentaram também diminuição dos níveis de ureia
217 sanguínea, o que pode sugerir deficiência proteica nesses casos. Também, esse achado tem
218 influência das citocinas inflamatórias secretadas pelos tumores independente da progressão
219 tumoral.

220 Variações de ALT (p=0.028) conforme o estágio tumoral verificada no estudo não
221 apresenta relevância clínica, uma vez que os resultados individuais e dos grupos
222 permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie.

223 Quanto ao perfil mineral, as variações da calcemia é controversa nas cadelas com
224 neoplasias mamárias. A hipercalcemia paraneoplásica verificada em carcinomas e

225 adenocarcinomas mamários^{1,24} não pode ser observada nesse estudo, no qual a hipocalcemia
226 foi identificada em 76% (n=19) dos animais estudados. Embora seja de ocorrência rara,¹ a
227 hipocalcemia nas cadelas com neoplasia mamária pode estar associada à secreção anormal de
228 calcitonina pelos tumores, como previamente descrito em humanos com câncer de mama.²⁵
229 No estudo, 8/19 animais apresentaram concomitantemente hipoalbuminemia que pode
230 ocasionar baixa quantidade de cálcio circulante uma vez que o cálcio plasmático é
231 transportado por essa proteína.²⁶

232 A hipoglicemia observada em 8% (n=2) dos indivíduos pode ter sido induzida pela
233 neoplasia, já descrita nos tumores mamários caninos¹, incluindo o carcinoma, que pode
234 ocasionar a expressão de fatores tumorais estimuladores da secreção de insulina como
235 observado em um relato de caso²⁷.

236 No estudo, as diversas alterações hematológicas e bioquímicas encontradas nas fêmeas
237 sugerem que a neoplasia mamária induza a síndrome paraneoplásica, que deve ser avaliada,
238 pois pode interferir nos tratamentos aplicados, no prognóstico e na sobrevida dos pacientes. O
239 número reduzido de animais amostrados pode ter influenciado na interpretação dos resultados
240 relacionados ao estadiamento tumoral já que houveram alterações nas variáveis hematológicas
241 e bioquímicas em determinados grupos de animais. Os achados sugerem a investigação
242 qualitativa e quantitativa das citocinas e fatores de crescimento além daqueles comumente
243 envolvidos e descritos nos processos neoplásicos em cães.

244

245 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 246 1. Bergman PJ. Paraneoplastic syndromes. In: Withrow, SJ, Vail, DM, Page RL. *Withrow &*
247 *MacEwen's Small animal clinical oncology*. 5th ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2013:83-
248 97.

- 249 2. Bergman PJ. Paraneoplastic syndromes. In: Withrow SJ, Vail DM. *Small animal clinical*
250 *oncology*. 4th ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2007:77-94.
- 251 3. Morrison WB. Paraneoplastic syndromes and the tumors that cause them. In: Morrison WB.
252 *Cancer in dogs and cats: medical and surgical management*. 2nd ed. Baltimore: Williams
253 & Wilkins; 2002:731-743.
- 254 4. Sharkey LC, Rosol TJ, Gröne A, Ward H, Steinmeyer C. Production of granulocyte colony-
255 stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by carcinomas in
256 a dog and a cat with paraneoplastic leukocytosis. *J Vet Intern Med*. 1996; 10:405-408.
- 257 5. Childress MO. Hematologic abnormalities in the small animal cancer patient. *Vet Clin North*
258 *Am Small Anim Pract*. 2012; 42:123-55.
- 259 6. Lana SE, Rutteman GR, Withrow SJ. Tumors of the mammary gland. In.: Withrow SJ,
260 Macewen E. *Small animal clinical oncology*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2007:
261 619-635.
- 262 7. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - Conselho Nacional de Controle de
263 Experimentação Animal – CONCEA. Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de
264 animais para fins científicos e didáticos – DBCA. 2003. Disponível em:
265 <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0226/226494.pdf>. Acesso em 14 mai. 2012.
- 266 8. Owen LN. *TNM classification of tumors of domestic animals*. 1 ed. Geneva: World Health
267 Organization; 1980:16-20.
- 268 9. Sorenmo KU, Worley DR, Goldschmidt MH. Tumors of the mammary gland. In: Withrow
269 SJ, Vail DM, Page RL. *Withrow & MacEwen's Small animal clinical oncology*. 5th ed. St.
270 Louis: Saunders Elsevier; 2013:538-556.
- 271 10. Madewell BR, Feldman BF. Characterization of anemias associated with neoplasia in small
272 animals. *J Am Vet Med Assoc*. 1980; 176:419-25.
- 273 11. Finora K. Common paraneoplastic syndromes. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2003; 18:123-
274 126.
- 275 12. Chun R. Paraneoplastic syndromes. In.: Henry CJ, Higginbotham ML. *Cancer management*
276 *in small animal practice*. Maryland Heights: Saunders Elsevier; 2010:94-100.
- 277 13. Mangieri J. Síndromes Paraneoplásicas. In: Daleck CR, De Nardi RB, Rodaski S.
278 *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Editora Roca; 2009:237-252.

- 279 14. Weiser MG. Erythrocyte volume distribution analysis in healthy dogs, cats, horses, and
280 dairy cows. *Am J Vet Res.* 1982; 43:163-166.
- 281 15. Souza AM, Camargo MB, Bacellar DTL, et al. Age and sex influence in canine red cell
282 distribution width (RDW-CV and RDW-SD) values. *R. bras. Ci. Vet.* 2012; 19:90-93.
- 283 16. Flaiban KKM da Costa, Balarin MTS. Estudo comparativo entre a amplitude de variação
284 dos eritrócitos (RDW-Red Blood Cell Distribution Width) e o volume globular (VG),
285 volume globular médio (VGM) e a presença de anisocitose em extensão sanguínea em
286 cães. *Ciências Agrárias.* 2004; 25:125-130.
- 287 17. Harvey JW. Evaluation of leucocytic disorders. In.: Harvey JW. *Veterinary hematology: a*
288 *diagnostic guide and color atlas.* St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders. 2012:122-176.
- 289 18. Couto CG. Tumor-associated eosinophilia in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1984; 184:837.
- 290 19. Losco PE. Local and peripheral eosinophilia in a dog with anaplastic mammary carcinoma.
291 *Vet. Pathol.* 1986; 23:536-538.
- 292 20. Radin MJ, Wellman ML. Granulopoiesis. In.: Weiss DJ, Wardrop KJ. *Schalm's Veterinary*
293 *hematology.* 6th ed. Ames, IA:Wiley-Blackwell; 2010:43-49.
- 294 21. Cerón JJ, Martínez-Subiela S, Ohno K, Caldin M. A seven-point plan for acute phase
295 protein interpretation in companion animals. *Vet J.* 2008; 177:6-7.
- 296 22. Pereira PCM, Burini RC. Reação metabólica à infecção no hospedeiro. *Revista do Hospital*
297 *das Clínicas da Faculdade de Medicina.* 1992; 47:111-115.
- 298 23. Corrêa CR, Burini RC. Proteínas plasmáticas positivas à fase aguda. *J. Bras. Patol. Med.*
299 *Lab.* 2000; 36: 48-56.
- 300 24. Sellon RK. Paraneoplastic syndromes in small animal medicine. *Abstracts European*
301 *Veterinary Conference Voorjaarsdagen;* 2008:133-134.
- 302 25. Hillyard V, Coombes RC, Greenberg PB, Galante SL. et al. Calcitonin in breast and lung
303 cancer. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1976; 5:1-8.
- 304 26. González FHD, SILVA SC da. *Introdução à bioquímica clínica.* 2nd ed. Porto Alegre:
305 Editora da UFRGS; 2006:364p.
- 306 27. Rossi G, Errico G, Perez P, Rossi G, Paltrinieri S. Paraneoplastic hypoglycemia in a
307 diabetic dog with na insulin growth fator-2-producing mammary carcinoma. *Vet. Clin.*
308 *Pathol.* 2010; 39:480-484.

- 309 28. Rizzi TE, Meinkoth JH, Clinkenbeard KD. Normal hematology of the dog. In.: Weiss DJ,
310 Wardrop KJ. *Schalm's Veterinary hematology*. 6th ed. Ames, IA:Wiley-Blackwell; 2010:
311 799-810.

Tabela 1. Dados do hemograma em cadelas com neoplasia mamária (n=25) de acordo com o estadiamento tumoral.

Variável	Valores de referência*	Estádio I (n=6)	Estádio II (n=5)	Estádio III (n=8)	Estádio IV (n=4)	Estádio V (n=2)	P
Eritrócitos (milhões/mm ³)	5.5-8.5	6.23 (5.46-6.98) 6.25	6.83 (2.56-7.47) 5.58	5.50 (4.40-7.95) 5.79	6.39 (4.20-6.76) 5.94	7.44 (7.14-7.73) 7.44	0.317
Hemoglobina (g/dL)	12-18	15.80 (13.3-17.9) 15.67	16.00 (5.9-18.6) 13.70	12.90 (10.3-16.8) 13.33	15.15 (8.6-16.0) 13.73	16.50 (16.0-17.0) 16.5	0.389
Hematócrito (%)	37-55	46.00 (37-50) 44.83	46.00 (17-52) 39.00	38.50 (31-50) 39.50	44.5 (26-46) 40.25	49.00 (48-50) 49.00	0.415
VCM (fL)	60-77	71.72 (67.76-74.10) 71.71	69.61 (66.40-75.60) 69.95	69.03 (61.45-74.42) 68.58	68.42 (61.90-70.44) 67.30	65.95 (64.68-67.22) 65.95	0.208
CHCM (%)	32-36	35.31 (33.41-35.94) 34.92	34.78 (34.19-35.77) 34.99	33.68 (32.05-35.42) 33.72	34.03 (33.07-34.78) 33.98	33.67 (33.33-34.00) 33.67	0.100
RDW (%)	14-17	13.55 (12.2-14.2) 13.45	13.60 (12.2-14.3) 13.54	14.75 (13.8-16.0) 14.84	14.45 (13.0-17.1) 14.75	14.55 (14.3-14.8) 14.55	0.015
Leucócitos totais (/μL)	6000-17000	9000 (6900-14400) 9633.33	9800 (6900-39400) 17960	18950 (8600-24000) 18112.50	16650 (8200-20800) 15575	14450 (10400-18500) 14450	0.202
Bastonetes (/μL)	0-300	0	0	0,0 (0-240) 55,63	0	0	0.213
Neutrófilos (/μL)	3000-11500	6333 (3975-10080) 6797.17	7546 (4485-34278) 14433.60	14694.5 (6450-21840) 13680.13	10232 (5904-16224) 10648	11548.50 (8112-14985) 11548.5	0.351
Eosinófilos (/μL)	100-1250	582 (0-975) 495.50	498 (394-1672) 762.60	1413 (240-4760) 1533.88	1235 (656-5510) 2159	329.50 (104-555) 329.50	0.229
Linfócitos (/μL)	1000-4800	1740 (1365-2736) 1862.67	1104 (1056-1992) 1282.40	1272 (240-2951) 1489.25	1787.5 (1066-2660) 1825.25	1809 (1768-1850) 1809	0.162
Monócitos (/μL)	150-1350	301.50 (138-1050) 478	880 (552-3546) 1481.40	1224 (516-1881) 1144.00	911 (429-1520) 942.75	763 (416-1110) 763	0.276

Dados apresentados pela mediana (mín-máx) e pela média.

Significância obtida pelo teste de Kruskal-Wallis.

* Valores de referência obtidos na literatura.²⁸

Tabela 2. Dados da avaliação bioquímica em cadelas com neoplasia mamária (n=25) de acordo com o estadiamento tumoral.

Variável	Valores de referência*	Estádio I (n=6)	Estádio II (n=5)	Estádio III (n=8)	Estádio IV (n=4)	Estádio V (n=2)	P
Albumina (g/L)	26-33	32.38 (22.53-38.90) 31.16	28.29 (23.60-35.33) 28.99	24.37 (22.18-29.80) 25.69	26.91 (18.43-29.3) 25.39	30.11 (27.32-32.89) 30.11	0.309
ALT (UI/L)	<102	52.71 (30.07-99.96) 56.54	25.69 (23.59-48.08) 30.33	36.40 (22.47-53.63) 36.10	25.29 (18.39-29.80) 24.69	35.15 (27.63-42.66) 35.15	0.028
Cálcio (mg/dL)	9-11.3	8.38 (5.18-10.98) 8.33	8.37 (7.39-9.20) 8.41	8.42 (6.52-10.81) 8.52	7.39 (6.70-8.94) 7.61	8.95 (8.65-9.24) 8.95	0.537
Creatinina (mg/dL)	0.5-1.5	0.78 (0.48-1.37) 0.83	1.12 (0.68-1.41) 1.01	0.89 (0.76-1.34) 0.98	0.68 (0.60-0.78) 0.69	1.2 (1.15-1.25) 1.2	0.145
FA (U/L)	<156	68.95 (6.30-141.00) 70.58	41.26 (22.51-77.75) 43.19	80.31 (63.69-135.20) 84.74	69.54 (17.80-88.89) 61.44	63.27 (35.76-90.77) 63.27	0.398
Glicose (mg/dL)	65-118	94.7 (58.78-134.20) 94.21	93.31 (75.15-97.52) 89.21	87.21 (69.70-114.60) 89.19	95.21 (63.69-104.08) 89.55	87.55 (76.86-98.24) 87.55	0.984
Uréia (mg/dL)	21-60	29.51 (16.98-55.31) 34.93	22.24 (17.61-45.30) 26.99	19.29 (11.31-60.20) 28.21	22.35 (12.38-36.83) 23.48	38.55 (36.00-41.09) 38.55	0.499

Dados apresentados pela mediana (mín-máx) e pela média.

Significância obtida pelo teste de Kruskal-Wallis.

*Valores de referência internos do laboratório.

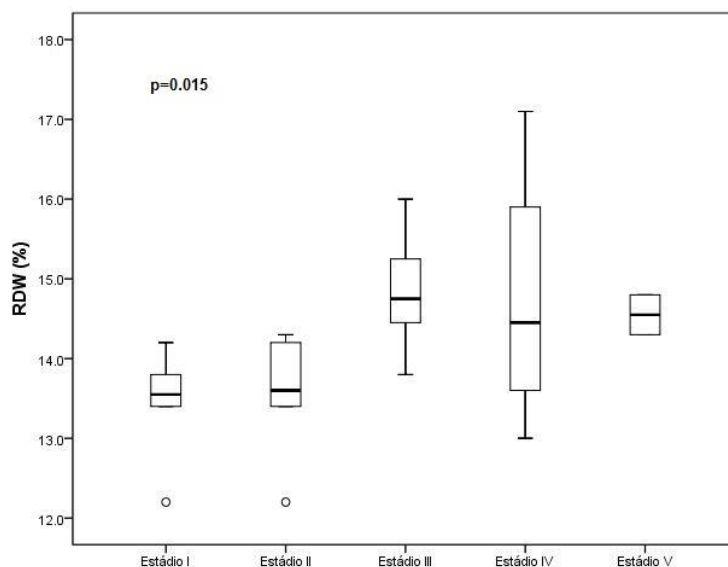


Figura 1. Boxplot do RDW, conforme o estadiamento tumoral. A parte superior e inferior da caixa indicam o quartil superior e inferior, respectivamente; a linha horizontal representa o valor da mediana e a linha vertical se estende do valor mínimo até valor máximo; os círculos representam os valores outliers. Significância obtida pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0.015$).

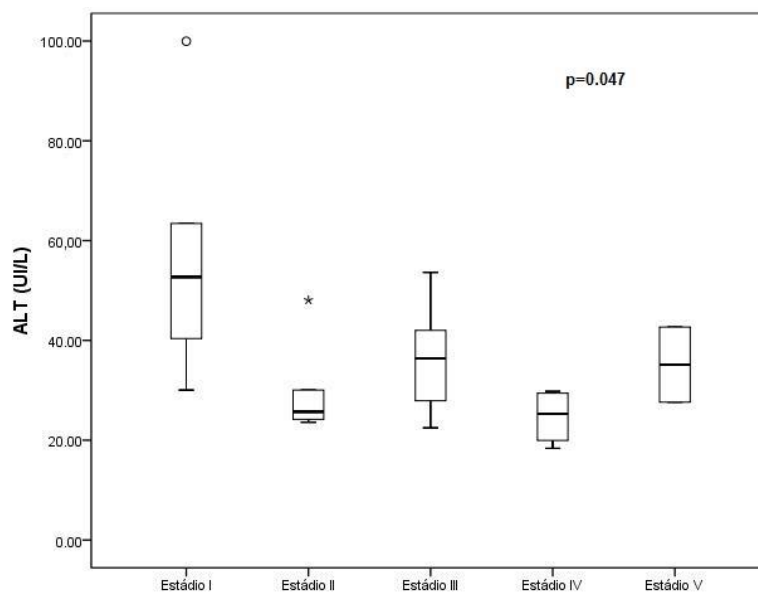


Figura 2. Boxplot do ALT conforme o estadiamento tumoral. A parte superior e inferior da caixa indicam o quartil superior e inferior, respectivamente; a linha horizontal representa o valor da mediana e a linha vertical se estende do valor mínimo até valor máximo; o círculo e o asterisco representam os valores outliers. Significância obtida pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0.047$).

5.2 Artigo científico 02

Alterações hemostáticas em fêmeas caninas com neoplasia mamária relacionadas com o estadiamento tumoral

Haemostatic alterations in female dogs with mammary neoplasm associated with tumor staging

Naila C. B. Duda¹, Juliana P. Matheus¹, Natália C. Angeli¹, Luciane C. Vieira², Luciana O. de Oliveira², Magnus L. Dalmolin³, Elisa M. Coelho¹, Ana P. Ravazollo⁴, Stella de F. Valle¹,
Félix H. D. González¹

¹Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVet) e ²Serviço de Oncologia Veterinária (ONCOVET), Hospital de Clínicas Veterinárias; ³ Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal e ⁴ Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Endereço para correspondência: Naila C. B. Duda, LACVet, Hospital de Clínicas Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, 91540-000, Porto Alegre, Brasil. E-mail: ncbduda@hotmail.com

1 **RESUMO**

2 **Background:** Desordens hemostáticas de origem paraneoplásica foram descritas em diversos
3 tipos de neoplasias que acometem cães e gatos, entretanto, os estudos que caracterizam as
4 anormalidades da coagulação relacionadas à neoplasia mamária bem como a demais tipos de
5 tumores ainda são escassos, uma vez que a avaliação de coagulopatias adquiridas por esse
6 tipo de tumor não são frequentes.

7 **Objetivo:** O objetivo desse estudo foi realizar a avaliação da coagulação (TP, TTPa, TT,
8 fibrinogênio plasmático e Dímero-D) e contagem plaquetária em cadelas acometidas por
9 neoplasia mamária para identificar a alteração mais frequente e relacionar as anormalidades
10 com o estadiamento tumoral conforme a classificação TNM adaptado para tumores de mama
11 em cadelas.

12 **Métodos:** Amostras de sangue de 25 cadelas acometidas por neoplasia mamária e 10 cadelas
13 saudáveis para o grupo controle foram coletadas para a determinação dos valores de TP,
14 TTPa, TT, fibrinogênio plasmático e Dímero-D. Os animais com neoplasias foram divididos
15 em cinco grupos conforme o estadiamento tumoral para tumor de mama em cadelas e
16 comparados com o grupo controle através dos testes estatísticos Kruskal-Wallis e post-hoc de
17 Tukey.

18 **Conclusões:** Não foram encontradas alterações sugestivas de coagulopatia adquirida nas 25
19 cadelas avaliadas. Entretanto, observou-se trombocitose e hiperfibrinogenemia em 32% e
20 68% dos indivíduos, respectivamente. A elevação do fibrinogênio plasmático foi relacionada
21 com o estadiamento tumoral, sendo mais evidente nos estádios II, III e V. Os indivíduos no
22 estágio V apresentaram concomitantemente valores discretamente aumentados de Dímero-D,
23 sugerindo uma resposta pró-inflamatória associada à doença.

24 **Palavras-chave:** avaliação hemostática; caninos; coagulopatia adquirida; estadiamento
25 tumoral; glândula mamária.

26 INTRODUÇÃO

27 Nas fêmeas caninas, as neoplasias mamárias correspondem a aproximadamente 50%
28 dos tumores e são mais comuns em cadelas de meia idade, sem que exista predisposição
29 racial.¹ Mais de 60% dessas neoplasias são malignas com metástases em 25% dos casos.² A
30 origem das síndromes paraneoplásicas (SPNs) nesse tipo de tumor ainda é pouco esclarecida,
31 porém, sabe-se que as manifestações mais comumente observadas são anemia, leucocitose,
32 trombocitopenias, coagulopatias e coagulação intravascular disseminada (CID).³⁻⁴ As
33 anormalidades nos testes de coagulação já foram identificadas em 67% (40/60) das fêmeas
34 com tumor de mama e anormalidades nos testes foram correlacionadas com a progressão
35 tumoral onde foram mais evidentes nos estádios III e IV.³

36 A importância da detecção de anormalidades da coagulação de origem paraneoplásica
37 em pacientes com neoplasia mamária se dá pela possibilidade de complicações hemorrágicas
38 durante o tratamento.⁵ Nos testes que avaliam a coagulação, a trombocitopenia,
39 prolongamento dos tempos de protrombina (TP), trombotestina parcial ativada (TTPa) ou
40 trombina (TT), elevação dos produtos de degradação da fibrina (PDFs) e diminuição dos
41 níveis de fibrinogênio plasmático podem ser identificados e sugerir anormalidades de origem
42 paraneoplásica.^{3,6-7} Adicionalmente, a determinação do Dímero D plasmático, um dos PDFs,
43 tem sido considerada um dos melhores marcadores biológicos para se entender o mecanismo
44 de ativação de procoagulantes e a CID.⁷⁻⁸

45 Em pacientes com câncer, a trombocitopenia pode ocorrer de forma secundária ao
46 tratamento quimioterápico e na ausência da ação dessas drogas, os mecanismos incluem o
47 aumento da destruição, sequestro/consumo de plaquetas ou redução da produção.⁴ O aumento
48 na utilização das plaquetas é relatado como o mecanismo final e mais significativo da
49 trombocitopenia em pacientes com câncer e resulta, na maior parte dos casos, de um estado de
50 hipercoagulabilidade.⁹⁻¹⁰

51 As informações relatadas mostram a importância da verificação dos parâmetros
52 hemostáticos nos pacientes oncológicos com objetivo de identificar, determinar o prognóstico
53 e providenciar o tratamento da síndrome previamente aos demais procedimentos terapêuticos.
54 Por esse motivo, o presente estudo objetiva avaliar a coagulação em cadelas com neoplasias
55 mamárias para identificar a alteração mais frequente e relacionar as anormalidades com o
56 estadiamento tumoral, através da classificação TNM modificada para os tumores mamários
57 caninos.¹¹

58

59 **MATERIAIS E MÉTODOS**

60 **Seleção dos animais e coleta das amostras**

61 O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade
62 Federal do Rio Grande do Sul (processo nº 23774 – CEUA/UFRGS) e todos os proprietários
63 concordaram em participar do estudo. Foram amostradas 37 fêmeas caninas de diversas raças
64 acometidas de neoplasia mamária, atendidas no Hospital de Clínicas Veterinárias da
65 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCV-UFRGS) durante um período de quatro
66 meses. Em todas, foi realizado exame clínico geral e específico da glândula mamária, aliado à
67 exames laboratoriais e investigação de metástases torácica e abdominal através de exames de
68 imagem (estudo radiográfico torácico e ultrassonografia abdominal). Pacientes com
69 comorbidades detectadas nos exames clínico, laboratorial e de imagem foram descartadas do
70 estudo.

71 Após a avaliação clínica foram coletadas amostras de sangue por punção venosa a
72 vácuo, após antissepsia adequada do local, com auxílio de agulha 21G na seguinte ordem: 4,5
73 mL em tubos com citrato de sódio tamponado a 3,2% para as provas de coagulação e 3 mL
74 em tubos com anticoagulante etilenodiaminotetracético dipotássico (EDTA-K₂) para
75 hemograma e contagem de plaquetas.

76 Animais que apresentavam doenças concomitantes que pudessem interferir na
77 avaliação hemostática, como outros tipos de neoplasias, falência de algum órgão e
78 hepatopatias foram descartados do estudo. Apenas as cadelas que estavam clinicamente aptas
79 e que obedeceram às diretrizes do estudo foram encaminhadas para o procedimento cirúrgico
80 conforme a indicação clínica.

81 A seleção do grupo controle, composto por 10 fêmeas saudáveis, foi baseada na
82 avaliação dos parâmetros clínicos e ausência de anormalidades hematológicas e bioquímicas.
83 Esse grupo foi utilizado para a determinação dos valores de referência para os testes
84 hemostáticos por meio de validação interna realizada pelo laboratório.

85

86 **Hematologia**

87 A contagem total de eritrócitos, leucócitos, a determinação da hemoglobina e a média
88 da distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW) foram realizadas em equipamento
89 automático (ABC Vet, ABX Micros, Horiba). O hematócrito foi determinado pelo método de
90 microhematócrito a 9.520 g por cinco minutos e os índices volume corpuscular médio (VCM)
91 e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados. A contagem
92 diferencial e a análise do esfregaço sanguíneo corado foram feitos através de microscopia
93 óptica pelo mesmo observador.

94

95 **Testes de coagulação**

96 As amostras de sangue obtidas em tubos de plástico com citrato de sódio tamponado a
97 3,2% foram centrifugadas imediatamente após a coleta por 15 min a 900 g e o plasma
98 acondicionado em tubos *ependorf* para congelamento a -80°C até o processamento que
99 ocorreu entre 0,5 e 3,5 meses. As análises do TP (HemoStat Thromboplastin SI, In Vitro
100 Diagnostica), TTPa (Hemostat aPTT-EL, In Vitro Diagnostica), TT (HemoStat Thrombin

101 Time, In Vitro Diagnostica) e fibrinogênio plasmático (HemoStat Fibrinogen, In Vitro
102 Diagnostica) foram determinadas em duplicata pelo método de formação de coágulo
103 (HumaClot Junior, In Vitro Diagnóstica) com as amostras rapidamente descongeladas em
104 banho-maria a 37°C. Para determinação do Dímero-D (Hemostat D-Dimer, In Vitro
105 Diagnóstica), as amostras foram analisadas em triplicata por turbidimetria (HumaClot Junior,
106 In Vitro Diagnóstica), onde considerou-se a média dos valores obtidos nos testes.

107

108 **Estadiamento tumoral**

109 As cadelas que estavam clinicamente aptas e obedeceram às diretrizes do estudo,
110 foram encaminhadas para o procedimento cirúrgico. As pacientes foram submetidas a
111 anestesia geral (inalatória) e analgesia de acordo com o estado clínico e a classificação
112 sugerida pela ASA (Associação Americana de Anestesiologia). Durante o procedimento de
113 mastectomia, as mamas removidas juntamente com os linfonodos regionais foram coletados e
114 fixados em formol tamponado a 10% e encaminhados ao Setor de Patologia Veterinária da
115 UFRGS para avaliação histopatológica e confirmação da origem tumoral, necessários para o
116 estadiamento tumoral e classificação através do sistema TNM¹² adaptado para tumores
117 mamários caninos.¹¹ Tal classificação é baseada em 5 estádios (graus I a V), através da
118 avaliação do tamanho do tumor primário (T), acometimento de linfonodos regionais (N) e
119 presença ou ausência de metástases à distância (M). Essa proposta modificada da versão
120 original determina a classificação dos estádios I, II e III conforme o tamanho tumoral: I,
121 menor que 3 cm; II, entre 3 e 5 cm; e III, maior que 5 cm. Metástase em linfonodos regionais
122 representa o estágio IV, independente do tamanho do tumor e a presença de metástase à
123 distância constitui o estágio V.^{11,13}

124

125 **Análise estatística**

126 Foram descritas as variáveis pela mediana, média, valor mínimo e valor máximo, e
127 foram comparadas entre os grupos conforme o estadiamento tumoral pela classificação TNM
128 através do teste de Kruskal-Wallis. Em caso de diferença significativa foram ordenadas as
129 variáveis por postos e comparadas entre os grupos pelo teste post-hoc de Tukey utilizando o
130 programa SPSS v 18.0. Considerou-se um nível de significância de 5%.

131

132 **RESULTADOS**

133 Do total de 37 cadelas selecionadas para o estudo, apenas 25 encontravam-se aptas e
134 foram utilizadas. A idade média dos animais amostrados, representadas por diversas raças, foi
135 de 9,72 anos (6 a 14 anos). A avaliação histológica dos tumores mamários dos 25 animais
136 permitiu classificar as neoplasias em grupos: carcinoma in situ (n=2 – 8%), carcinoma
137 complexo (n=4 – 16%), carcinoma simples (n=8 – 32%), grupo composto por carcinoma
138 tubulopapilar (n=4 – 12%), carcinoma sólido (n=2 – 8%) e carcinoma anaplásico (n=2 – 8%),
139 sarcoma (n=1 – 4%) representado por osteossarcoma de origem mioepitelial de mama,
140 carcinosarcoma (n=6 – 24%), mioepitelioma (n=1 – 4%), carcinoma em tumor misto (n=2 –
141 8%) e tumor misto benigno (n=1 – 4%). A partir dessa classificação, realizou-se o
142 estadiamento tumoral conforme o sistema TNM adaptado para tumores mamários caninos,
143 distribuindo-se os animais do estudo nos cinco grupos: estágio I (n=6), estágio II (n=5),
144 estágio III (n=8), estágio IV (n=4) e estágio V (n=2).

145 As variáveis de coagulação e contagem plaquetária dos grupos avaliados estão
146 descritas na Tabela 1. Foi verificada diferença significativa entre os grupos na avaliação do
147 TP (p=0.036), TT (p=0.003) e fibrinogênio plasmático (p=0.003) (Figura 1). Entretanto, a
148 diferença observada no TP pelo teste de Kruskal-Wallis não foi evidenciada no teste Post-
149 Hoc.

150 Embora na contagem de plaquetas não tenha sido observada diferença significativa
151 ($p=0.970$) entre os grupos, oito fêmeas (32%) pertencentes aos grupos I ($n=2$), II ($n=2$), III
152 ($n=3$), IV ($n=1$) apresentaram trombocitose e os valores mediano e a média dos grupos se
153 mantiveram dentro dos valores de referência.

154 Houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo I ($p=0.001$), e entre os
155 grupos I e III ($p=0.002$) para o TT, sendo que o valor mediano e a média do grupo I foram
156 inferiores aos valores dos grupos controle e III. Na comparação entre os grupos controle e IV
157 e entre os grupos I e V, os valores obtidos apresentaram-se discretamente acima do limite da
158 significância ($p=0.055$ e $p=0.052$, respectivamente).

159 A elevação dos valores de fibrinogênio foi observada em 17 indivíduos (68%)
160 pertencentes aos cinco estádios tumorais, cujos valores aumentaram conforme o estadiamento
161 tumoral, sendo mais evidente nos estádios II, III e V, no qual verificou-se diferença
162 significativa na comparação com o grupo controle ($p=0.050$, $p=0.001$, $p=0.005$,
163 respectivamente). Esses grupos apresentaram valores medianos e médios de fibrinogênio
164 (156,2 e 173,84; 224,0 e 219,82; 304,50 e 304,50 mg/dL, respectivamente) superiores aos do
165 grupo controle (88 e 87,18 mg/dL).

166 Embora não tenha sido verificada diferença significativa do Dímero-D ($p=0.230$) entre
167 os grupos, o grupo V apresentou valores superiores aos demais grupos. Dois indivíduos
168 pertencentes ao grupo III e dois do grupo V (16%) apresentaram elevação nos valores do
169 Dímero-D.

170

171 **DISCUSSÃO**

172 O presente estudo avaliou a variação dos testes de coagulação entre grupos de fêmeas
173 com neoplasia mamária com objetivo de identificar anormalidades e relacionar com o
174 estadiamento da doença. Até o presente momento, investigações das síndromes

175 paraneoplásicas de origem hematológica são escassas na medicina veterinária porém requer
176 aprofundamento com objetivo de proporcionar o conhecimento de condições que possam
177 prejudicar o andamento dos tratamentos cirúrgicos ou quimioterápicos desses pacientes.

178 A trombocitose constatada em 32% das fêmeas avaliadas, é frequentemente observada
179 em pacientes humanos com câncer embora na medicina veterinária, seja considerada um raro
180 achado.^{9,14} Alguns estudos contradizem os estudos anteriores citando que a trombocitose seja
181 um achado comum em cães e gatos com neoplasia^{15,16} e de mecanismo não esclarecido
182 completamente. Sugere-se que pode resultar de contração esplênica por influência da
183 adrenalina e em resposta a liberação de fatores tumorais pró-angiogênicos e citocinas
184 inflamatórias (como as IL-1 e IL-6) ou fatores de crescimento hematopoiéticos^{9,17} secretados
185 ou induzidos pelo tumor. Em tumores mamários caninos, como não existem estudos sobre as
186 alterações de coagulação, os mecanismos exatos para trombocitose, nesse caso, não puderam
187 ser elucidados. O resultado encontrado pode significar que a verdadeira ocorrência de
188 trombocitose nos animais com neoplasia possa estar sendo subestimada.⁹

189 O prolongamento dos tempos de coagulação em animais com neoplasia pode estar
190 associado a secreção das citocinas pró-inflamatórias que promovem o aumento no consumo
191 dos fatores de coagulação.¹⁸ Nenhum indivíduo apresentou elevação de TP e apenas um
192 indivíduo do grupo IV apresentou elevação do TTPa, entretanto, não houve diferença
193 significativa entre os grupos avaliados, contradizendo um estudo que observou
194 prolongamento dos tempos de coagulação em cadelas com carcinoma mamário com
195 estadiamento IV.³ Esse achado corrobora com outro trabalho que não observou diferença
196 significativa no TP e TTPa entre os cães com carcinoma e o grupo controle composto por
197 animais saudáveis¹⁷ e também com outro estudo, que não obteve diferença nos tempos de
198 coagulação conforme a progressão da doença entre os diferentes tipos tumorais.¹⁸

199 A elevação dos valores de fibrinogênio foi observada em 17 indivíduos (68%)
200 pertencentes aos cinco estádios tumorais, cujos valores aumentaram conforme a progressão
201 tumoral, sendo mais evidente nos estádios II, III e V. A hiperfibrinogenemia já foi associada a
202 progressão e a extensão do câncer em pacientes caninos¹⁸ e em pacientes humanos,¹⁹ cuja
203 alteração foi verificada em 83% dos casos de tumores sólidos sem diagnóstico de CID.²⁰ Em
204 cadelas com carcinoma mamário, 23.3% apresentaram valores elevados de fibrinogênio sendo
205 mais evidente nos estádios III e IV.³ O fibrinogênio, uma glicoproteína plasmática de fase
206 aguda sintetizada pelo fígado e um integrante da via comum da coagulação,²¹ possui aumento
207 da sua biossíntese com a inflamação, estresse, ou infecção devido à resposta de fase aguda,
208 sendo observada também em casos de malignidade disseminada,²² devido ao dano tecidual
209 ocasionado pelo crescimento tumoral infiltrativo.²⁰ Em animais com neoplasias, os achados
210 de elevação do fibrinogênio podem ser atribuídos ao processo inflamatório onde ocorre a
211 secreção de IL-6.¹⁷ No entanto, a relação com a progressão do tumor de mama é evidente e
212 requer atenção já que em outro estudo, a hiperfibrinogenemia foi relacionada a síndrome de
213 hipercoagulabilidade.¹⁷

214 O TT e mensuração da concentração do fibrinogênio avaliam a conversão do
215 fibrinogênio em fibrina e são sensíveis apenas para deficiência, disfunção ou inibição do
216 fibrinogênio.²³ Quando os valores de TT estão prolongados, um defeito quantitativo congênito
217 ou adquirido (deficiência de fibrinogênio) ou qualitativo (disfunção do fibrinogênio) está
218 presente e pode ser observado nas elevações dos PDFs, na hipoalbuminemia, na deficiência
219 do fator XIII e amiloidose.²⁴ A elevação do TT também pode ocorrer na CID,³ o que não foi
220 observado em nenhum animal desse estudo. A diminuição dos valores de TT pode ser
221 associada a elevação dos níveis de fibrinogênio plasmático como previamente descrito,²⁵
222 entretanto, no presente estudo, essa alteração foi observada apenas no grupo I, não estando

223 relacionado a elevação do fibrinogênio, uma vez que não houve diferença na comparação
224 dessa variável com o grupo controle.

225 Valores elevados de Dímero-D podem ser observados na CID, no tromboembolismo
226 venoso, após procedimentos cirúrgicos, na anemia hemolítica imunomediada, em doenças
227 hepáticas e renais, na insuficiência cardíaca, em condições neoplásicas e hemorragia
228 interna.²⁶⁻²⁷ No presente estudo, associou-se a elevação do Dímero-D com a inflamação
229 ocasionada pelo processo neoplásico, pois esses indivíduos apresentaram concomitantemente
230 valores elevados de fibrinogênio (209-355 mg/dL). Dos quatro indivíduos desse estudo, dois
231 pertenciam ao grupo V, corroborando com outro estudo, que observou elevação significativa
232 dos níveis de Dímero-D e fibrinogênio em pacientes caninos com metástases à distância
233 quando comparados aos pacientes com doença local invasiva.¹⁸ Embora não tenha diferença
234 significativa entre os grupos os achados sugerem que possa existir uma relação entre os
235 valores de Dímero-D e o estadiamento tumoral indicando que pacientes em estágios finais
236 (metástases distantes) possam apresentar a coagulopatia de consumo e piorar o prognóstico da
237 doença.

238 Como conclusão, a trombocitose e a hiperfibrinogenemia podem estar relacionadas a
239 uma resposta pró-inflamatória associada ao estadiamento da doença. Isso sugere a realização
240 de mais estudos, com o objetivo de elucidar a importância clínica desses resultados bem como
241 estabelecer o mecanismo das alterações.

242

243 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 244 1. Oliveira LO, Oliveira RT, Loretto AP, Rodrigues R, Driemeier D. Aspectos epidemiológicos
245 das neoplasias mamárias canina. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2003; 31:105-110.
- 246 2. De Nardi AB, Rodaski S, Rocha NS, Fernandes SC. Neoplasias Mamárias. In: Daleck CR,
247 De Nardi RB, Rodaski, S. *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Editora Roca; 2009:372-
248 383.

- 249 3. Stockhaus C, Kohn B, Rudolph R, Brunneberg L, Giger U. Correlation of haemostatic
250 abnormalities with tumor stage and characteristics in dogs with mammary carcinoma. *J*
251 *Small Anim Pract.* 1999; 40:326-331.
- 252 4. Bergman PJ. Paraneoplastic syndromes. In: Withrow SJ, Vail DM. *Small animal clinical*
253 *oncology.* 4th ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2007:77-94.
- 254 5. Mangieri J. Síndromes Paraneoplásicas. In: Daleck CR, De Nardi RB, Rodaski S. *Oncologia*
255 *em cães e gatos.* São Paulo: Editora Roca; 2009:237-252.
- 256 6. Stokol T, Brooks M, Erb H, Mauldin GE. Evaluation of kits for the detection of fibrin(ogen)
257 degradation products in dogs. *J Vet Intern Med.* 1999; 13:478-484.
- 258 7. Brooks MB, Laforcade A. Acquired coagulopathies. In.: Weiss DJ, Wardrop KJ. *Schalm's*
259 *Veterinary Hematology.* 6th ed. Iowa: Blackwell Publishing; 2010:654-660.
- 260 8. Machida T, Kokubu H, Matsuda K, Miyoshi K, Uchida E. Clinical use of D-dimer
261 measurement for the diagnosis of disseminated intravascular coagulation in dogs. *J Vet*
262 *Med Sci.* 2010; 72:1301-1306.
- 263 9. Childress MO. Hematologic abnormalities in the small animal cancer patient. *Vet Clin North*
264 *Am Small Anim Pract.* 2012; 42:123-55.
- 265 10. Caine GJ, Stonelake PS, Lip GYH, Kehoe ST. The hypercoagulable state of malignancy:
266 pathogenesis and current debate. *Neoplasia.* 2002; 4:465-473.
- 267 11. Lana SE, Rutteman GR, Withrow SJ. Tumors of the mammary gland. In.: Withrow SJ,
268 Macewen E. *Small animal clinical oncology.* 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2007:
269 619-635.
- 270 12. Owen LN. *TNM classification of tumors of domestic animals.* 1 ed. Geneva: World Health
271 Organization; 1980:16-20.
- 272 13. Sorenmo KU, Worley DR, Goldschmidt MH. Tumors of the mammary gland. In: Withrow,
273 SJ, Vail, DM, Page RL. *Withrow & MacEwen's Small animal clinical oncology.* 5th ed. St.
274 Louis: Saunders Elsevier; 2013:538-556.
- 275 14. Bergman PJ. Paraneoplastic syndromes. In: Withrow, SJ, Vail, DM, Page RL. *Withrow &*
276 *MacEwen's Small animal clinical oncology.* 5th ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2013:83-
277 97.

- 278 15. Hammer AS. Thrombocytosis in dogs and cats: a retrospective study. *Comparative*
279 *Haematology International*; 1991:181-186.
- 280 16. DeSancho MT, Rand JH. Coagulopathic complications of cancer patients. In.: Hong WK,
281 Bast RC, Hait WN, et al. *Cancer medicine*. 8th ed. Shelton: PMPH-USA Ltd; 2010:1813-
282 1822.
- 283 17. Saavedra, PV, García AL, López SZ, Couto G. Hemostatic abnormalities in dogs with
284 carcinoma: *A thromboelastographic characterization of hypercoagulability*. *Vet J*. 2011;
285 190:78-83.
- 286 18. Andreasen EB, Tranholm M, Wiinberg B, Markussen B, et al. Haemostatic alterations in a
287 group of canine cancer patients are associated with cancer type and disease progression.
288 *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2012; 54:1-8.
- 289 19. Rickles FR, Levine M, Edwards RL. Hemostatic alterations in cancer patients. *Cancer*
290 *Metastasis Rev*. 1992; 11:237-248.
- 291 20. Kies MS, Posch JJ Jr, Giolma JP, Rubin RN. Hemostatic function in cancer patients.
292 *Cancer*. 1980; 15:831-837.
- 293 21. Ameri M, Schnaars, HA, Sibley JR, Honor JD. Determination of plasma fibrinogen
294 concentrations in Beagle Dogs, Cynomolgus Monkeys, New Zealand White Rabbits, and
295 Sprague–Dawley Rats by using Clauss and Prothrombin-Time–Derived assays. *J Am Assoc*
296 *Lab Anim Sci*. 2011; 50:864-867.
- 297 22. Herring J, McMichael M. Diagnostic approach to small animal bleeding disorders. *Top*
298 *Companion Anim Med*. 2012; 27:73-80.
- 299 23. Brooks MB, Catalfamo JL. Current diagnostic trends in coagulation disorders among dogs
300 and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2013; 43:1349-1372.
- 301 24. Palmer RL. Laboratory diagnosis of bleeding disorders. Basic screening tests. *Journal of*
302 *Postgraduation Medicin*. 1984;76:137-142.
- 303 25. Kurata M, Sasayama, Y, Yamasaki N, et al. Mechanism for shortening PT and APTT in
304 dogs and rats – effect of fibrinogen on PT and APTT. *J Toxicol Sci*. 2003; 28:439-43.
- 305 26. Nelson OL, Andreasen C. The utility of plasma D-dimer to identify thromboembolic disease
306 in dogs. *J Vet Intern Med*. 2003; 17:830-834.

- 307 27. Levi M, Cate HT. Disseminated intravascular coagulation. *The New England Journal of*
308 *Medicine*. 1999; 341:586-592.
- 309 28. Rizzi TE, Meinkoth JH, Clinkenbeard KD. Normal hematology of the dog. In.: Weiss DJ,
310 Wardrop KJ. *Schalm's Veterinary hematology*. 6th ed. Ames, IA:Wiley-Blackwell; 2010:
311 799-810.
- 312

Tabela 1 – Dados da avaliação hemostática de cadelas com neoplasia mamária (n=25) de acordo com o estadiamento tumoral.

Variável	Grupo Controle (n=10)	Estádio I (n=6)	Estádio II (n=5)	Estádio III (n=8)	Estádio IV (n=4)	Estádio V (n=2)	P
TP (s)	6.3 (5.80-6.85) 6.34	5.88 (5.55-6.30) 5.88	6.25 (5.70-6.85) 6.18	5.95 (5.40-6.30) 5.91	6.33 (6.00-6.75) 6.35	6.48 (6.40-6.55) 6.48	0.036
TTPa (s)	16.55 (14.65-18.25) 16.60	15.1 (14.05-16.30) 15.06	16.3 (14.80-17.85) 16.25	16.98 (14.10-18.05) 16.59	18.75 (15.90-21.90) 18.83	16.38 (15.60-17.15) 16.38	0.076
TT (s)	8.7 (8.20-9.50) 8.78	6.9 (6.60-7.80) 7.05	8.8 (6.20-9.30) 8.1	8.85 (7.90-9.70) 8.80	7.85 (6.90-8.10) 7.68	8.85 (8.30-9.40) 8.85	0.003
Fibrinogênio (mg/dL)	88 (70.5-121.0) 87.18	101.5 (82.0-153.0) 109.42	156.2 (84.0-314.0) 173.84	224 (86.5-353.0) 219.82	132.5 (82.5-238.5) 146.50	304.50 (254-355.0) 304.50	0.003
Dímero-D (ng/ml)	59 (30-88) 54.96	44 (26-86) 47.67	30 (2-86) 35.80	30 (2-464) 105.25	44 (30-58) 44	156 (114-198) 156	0.230
Plaquetas (/mm ³)	200000-500000*	448000 (410000-601000) 477400	452000 (223000-771000) 459200	472000 (258000 - 588000) 445125	338000 (308000-606000) 417333.33	408500 (357000-460000) 408500	0.970

Dados apresentados pela mediana (mín-máx) e pela média.

Significância obtida pelo teste de Kruskal-Wallis.

TP: tempo de protrombina; TTPa: tempo de tromboplastina parcial ativada e TT: tempo de trombina.

*Valores de referência obtidos na literatura.²⁸

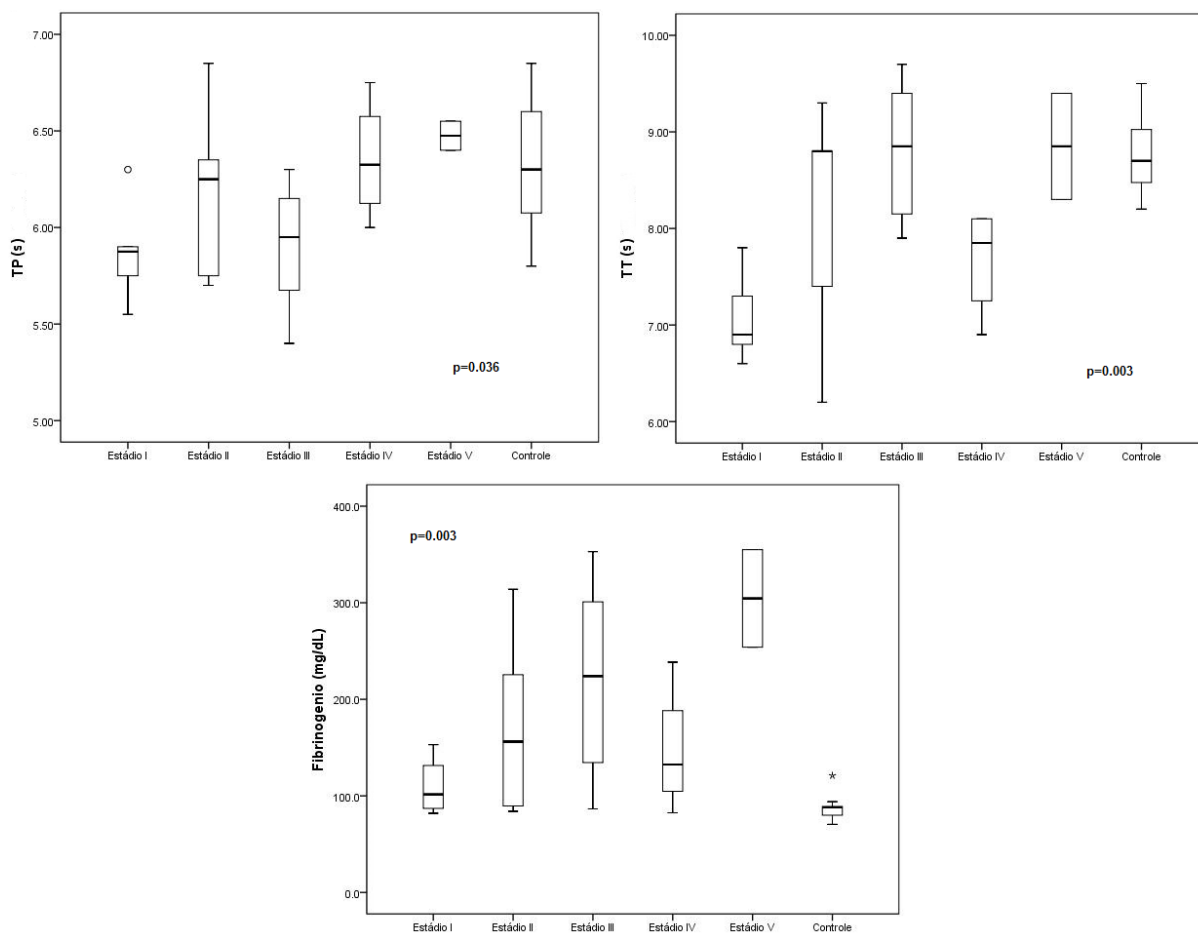


Figura 2. Boxplot do TP, TT e fibrinogênio, conforme o estadiamento tumoral em comparação com o grupo controle. A parte superior e inferior da caixa indicam o quartil superior e inferior, respectivamente; a linha horizontal representa o valor da mediana e a linha vertical se estende do valor mínimo até valor máximo; o círculo e o asterisco representam os valores outliers. Significância obtida pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0.036$; $p=0.003$ e $p=0.003$, respectivamente).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As alterações hematológicas, como leucocitose neutrofílica, anemia, monocitose e eosinofilia; bioquímicas, como hipocalcemia, diminuição dos níveis de ureia sanguínea, hipoalbuminemia e hipoglicemia; e de hemostasia, como trombocitose e hiperfibrinogenemia, encontradas nas fêmeas desse estudo, sugerem que a neoplasia mamária induza a síndrome paraneoplásica e podem estar relacionadas a uma resposta pró-inflamatória associada ao estadiamento da doença. Isso sugere a realização de mais estudos, com o objetivo de elucidar a importância clínica desses resultados bem como estabelecer o mecanismo das alterações.

Na realização desse trabalho pode-se observar que as investigações das síndromes paraneoplásicas são escassas na medicina veterinária, o que requer aprofundamento, uma vez que essas anormalidades prejudicam a condição clínica do paciente. O conhecimento das síndromes paraneoplásicas pode contribuir para a instituição adequada de terapia previamente aos procedimentos cirúrgicos e/ou quimioterápicos, auxiliando no estabelecimento do prognóstico e propiciando uma melhora na qualidade de vida desses pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, D.C. Diagnóstico dos distúrbios hemostáticos. In: THRALL, M.A. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. São Paulo: Roca. 2010, p. 170-187.
- BERGMAN, P.J. Paraneoplastic syndromes. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. *Small animal clinical oncology*. 4th ed. St. Louis: Saunders Elsevier. 2007, p. 77-94.
- BERGMAN, P.J. Paraneoplastic syndromes. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R. L. *Withrow & MacEwen's Small animal clinical oncology*. 5th ed. St. Louis: Saunders Elsevier. 2013. p. 83-97.
- BROOKS, M. B.; LAFORCADE, A. Acquired coagulopathies. In.: WEISS, D.J. WARDROP, K.J. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th ed. Iowa: Blackwell Publishing. 2010, p. 654-660.
- CARDOSO, M.J.L.; MACHADO, L.H.A.; MOUTINHO, F.Q.; PADOVANI, C.R. Linfoma canino – achados clínico-patológicos. *Archives of Veterinary Science*, v. 9, n. 2. 2004. p. 25-29.
- CHILDRESS, M. O. Hematologic abnormalities in the Small Animal Cancer Patient. *Veterinary Clinical Small Animal*, v. 42, n. 1. 2012. p. 123-155.
- De NARDI, A.B.; RODASKI, S.; ROCHA, N.S.; FERNANDES, S.C. Neoplasias Mamárias. In: DALECK, C.R.; De NARDI, R.B.; RODASKI, S. *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Editora Roca. 2009, p. 372-383.
- DeSANCHO, M. T.; RAND, J. H. Coagulopathic complications of cancer patients. In.: HONG, W. K.; BAST, R. C.; HAIT, W. N.; *et al. Cancer medicine*. 8th ed. Selton (CT): PMPH-USA. 2010. p. 1813-1822.
- HACKNER, S.G.; SCHAER, B.D. Trombotic Disorders. In: WEISS, D.J. WARDROP, K.J. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th ed. Iowa: Blackwell Publishing. 2010. p. 668-678.
- HAMILTON, J. M.; WRIGHT, J.; KIGHT, D. Alkaline phosphatase levels in canine mammary neoplasia. *Veterinary record*, v. 93, n. 5. 1973. p. 121-123.
- KARAYANNOPOULOU, M.; POLIZOPOULOU, Z. S.; KOUTINAS, A. F.; *et.al.* Serum alkaline phosphatase isoenzyme activities in canine malignant mammary

neoplasms with and without osseous transformation. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 35, n. 3. 2006. p. 287-290.

KUBOTA, A.; KANO, R.; MIZUNO, T.; HISASUE, M.; MOORE, P.F.; WATARI, T.; TSUJIMOTO, H.; HASEGAWA, A. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) produced by dog lymphoma cells. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 64, n. 9. 2002. p. 835-837.

LEVI, M; CATE, H.T. Disseminated intravascular coagulation. *The New England Journal of Medicine*, v.341, n. 8.1999. p. 586-592.

MACHIDA, T.; KOKUBU, H.; MATSUDA, K.; MIYOSHI, K.; UCHIDA, E. Clinical use of D-dimer measurement for the diagnosis of disseminated intravascular coagulation in dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 72, n. 10. 2010. p.1301-1306.

MANGIERI, J. Síndromes Paraneoplásicas. In: DALECK, C.R.; De NARDI, R.B.; RODASKI, S. *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Editora Roca. 2009, p. 237-252.

MORRISON, W.B. Paraneoplastic syndromes and the tumors that cause them. In: MORRISON, W.B. *Cancer in dogs and cats: medical and surgical management*. 2th ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 2002, p. 731-743.

OLIVEIRA, L.O.; OLIVEIRA, R.T.; LORETTI, A.P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos das neoplasias mamárias canina. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31, n. 2. 2003. p. 105-110.

SHARKEY, L.C.; ROSOL, T. J.; GRÖNE, A.; WARD, H.; STEINMEYER, C. Production of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by carcinomas in a dog and a cat with paraneoplastic leukocytosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 10, n. 6, 1996. p. 405-408.

STOKOL, T.; BROOKS, M.; ERB, H.; MAULDIN, G.E. Evaluation of kits for the detection of fibrin(ogen) degradation products in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 13, 1999. p. 478-484.

STOKOL, S. Essencial thrombocythemia and reative thrombocytosis. In.: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. *Schalm's veterinary hematology*. 6th ed. Philadelphia: Blacwell Publishing. 2010. p. 605-611.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Hemostasia. In.: *Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária*. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 213-262.

STOCKHAUS, C.; KOHN, B.; RUDOLPH, R.; BRUNNEBERG, L.; GIGER, U. Correlation of haemostatic abnormalities with tumor stage and characteristics in dogs with mammary carcinoma. *Journal of Small Animal Practice*, v. 40, n. 7. 1999. p.326-331.

THOMAS, I.; SCHWARTZ R. A. Cutaneous Paraneoplastic syndromes: uncommon presentations. *Clinical Dermatology*, v. 23. 2005. p.593-600.

WELLER, R.E.; HOFFMAN, W.E. Renal function in dogs with lymphosarcoma and associated hypercalcemia. *Journal of Small Animal Practice*, v.33, n.1. 1992. p.61-66.

WELLER, R.E.; HOLMBERG, C.A.; THEILEN, G.H. Canine lymphosarcoma and hypercalcemia: clinical, laboratory and pathologic evaluation of twenty-four cases. *Journal of Small Animal Practice*, v.23. 1992. p.649-658.