



Comunicação

[Communication]

Dosagem sérica do marcador tumoral CA 15.3 em cadelas portadoras de neoplasias mamárias pelo método de eletroquimioluminescência

[Serum dosage of the tumor marker Ca 15.3 in bitches presenting mammary neoplasia with the chemiluminescence method]

P.B. Araújo¹, D.S.P. Campinho¹,
F.S. Mendonça², J. Evêncio Neto^{2*}

¹Aluno de pós-graduação - Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife, PE

²Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife, PE

Marcadores tumorais ou biomarcadores são substâncias que estão presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, ou primariamente produzidos pelo próprio tumor, ou secundariamente pelo paciente em resposta a este primeiro. A concentração dessas substâncias deve refletir a extensão do tumor, a resposta ao tratamento e a progressão da doença (Jacobs e Haskell, 1991). Em humanos, marcadores séricos tumorais desenvolvem um importante papel no manejo do paciente. Numerosos marcadores tumorais séricos têm sido descritos para uso em câncer de mama e hoje o CA 15.3 é um dos mais indicados na prática clínica em humanos. Contudo, os estudos sobre esses marcadores para a medicina veterinária ainda são escassos (Campos *et al.*, 2012).

O antígeno do câncer 15.3 (CA 15.3) é uma glicoproteína com alto peso molecular, produto do gene MUC1, e está relacionado à adesão celular. MUC1 é responsável por diversas propriedades celulares, que incluem proliferação celular, adesão, apoptose e invasão. A sensibilidade desse marcador varia de acordo com a massa tumoral e o estadiamento clínico da doença, apresentando níveis séricos elevados em 60 a 80% das pacientes com metástases em câncer de mama. A dosagem do CA 15.3 no pré-operatório para câncer de mama em mulheres, em estágio inicial, parece ter uma relação positiva, pois pode orientar para uma terapia

coadjuvante mais agressiva ou apropriada a cada caso (Souza, 2002). Em humanos, altos níveis séricos de CA 15.3 estão correlacionados com o tamanho do tumor, o estágio da doença e a presença de metástase em linfonodos (Manuali *et al.*, 2012).

A concentração da maioria dos marcadores tumorais é extremamente baixa no sangue, por isso o método que avalia os marcadores deve ser muito sensível (Souza, 2002). A vantagem da detecção por meio da eletroquimioluminescência em comparação com os demais métodos consiste na preparação simples, na alta estabilidade dos reagentes em uma grande sensibilidade do teste. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar os níveis séricos do marcador tumoral CA 15.3 em cadelas híidas e em cadelas portadoras de neoplasias mamárias, relacionando-se os resultados ao tipo tumoral, ao estadiamento clínico, ao tempo de evolução do quadro e à presença de ulceração e de vascularização.

Para realização do estudo, foram utilizadas 60 cadelas de diferentes idades e raças, sendo 30 dessas cadelas portadoras de neoplasias mamárias, atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Hovet – UFRPE). Outras 30 cadelas híidas provenientes de abrigos foram utilizadas para composição do grupo controle. O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (Ceua) da UFRPE, com licença de número 055/2015.

Recebido em 4 de agosto de 2018

Aceito em 21 de março de 2019

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: joaquim.evenciont@ufrpe.br

Os animais portadores de neoplasias mamárias participantes do estudo foram submetidos a exame clínico, hemograma e exames de imagem (radiografia de tórax e ultrassonografia de abdômen). Estes últimos foram indicados para investigação de metástase pulmonar e abdominal, respectivamente. Os animais portadores de metástases em órgãos torácicos ou abdominais não foram incluídos no estudo. Os tutores dos animais participantes da pesquisa responderam um questionário sobre fatores epidemiológicos que pudessem influenciar, de alguma forma, o processo neoplásico.

Após realização dos exames pré-operatórios, os animais foram encaminhados para a cirurgia, durante a qual foi feita coleta de linfonodos e de tecido mamário neoplásico para realização de exame histopatológico. Estes foram fixados em formol neutro tamponado a 10%. Após a fixação, os fragmentos de tumor foram conservados em álcool etílico a 70%. Em seguida, foram desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina histológica líquida a 59°C. Posteriormente, os blocos foram cortados a 5µm em micrótomo semiautomático tipo Minot. Os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina e observados em microscópio óptico biológico trinocular Nikon 50i, acoplado a um sistema de câmera digital usado para capturar imagens microscópicas. A classificação histológica das neoplasias foi feita de acordo com Cassali *et al.* (2014). Com base nos dados coletados na anamnese, no exame clínico e na aplicação do questionário, os animais foram agrupados de acordo com tipo tumoral, estadiamento clínico (Tab. 1), tempo de evolução da neoplasia, presença de ulcerações e de vascularização.

Tabela 1. Estadiamento clínico das neoplasias mamárias caninas

Estágio	Classificação TNM
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T3 N0 M0
IV	Qualquer T N1 M0
V	Qualquer T Qualquer N M1

Adaptado de Midsorp (2002).

Os tubos contendo as amostras de sangue foram submetidos à centrifugação, por um período de 15 minutos a 500G. As alíquotas de soro foram acondicionadas em tubos de polietileno, tipo

Eppendorf e armazenadas à temperatura de -20°C. Para a determinação sérica do marcador, foi empregada a técnica de eletroquimioluminescência, utilizando-se *kit* comercial (*Kit* de reagentes Access BR Monitor). Realizou-se uma análise de normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Com base nessa análise, empregaram-se os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para as variáveis não paramétricas. O programa IBM SPSS Statistics 23.0 foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos, e o nível de significância adotado foi de 5,0%.

Observou-se maior frequência de neoplasias malignas (76,7%), destacando-se entre elas o carcinoma em tumor misto (26,7%) (Tab. 2). Oliveira *et al.* (2003) observaram que 71,8% das cadelas participantes de seu estudo eram portadoras de neoplasias malignas. Esse resultado é semelhante ao encontrado no presente trabalho. Já para Queiroga e Lopes (2002), aproximadamente 52% dos tumores mamários caninos são malignos. Outros trabalhos recentes também vêm relatando frequências superiores, semelhantes às aqui encontradas (Oliveira Filho *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2012). Entre as variáveis que podem determinar o prognóstico, o tipo tumoral pode ser identificado como um importante fator independente.

Tabela 2. Frequências dos tipos histológicos em cadelas portadoras de neoplasias mamárias

Tipo de tumor	FA	FR%
Adenoma	4	13,3%
Adenoma complexo	2	6,7%
Fibroadenoma	1	3,3%
Carcinoma anaplásico	1	3,3%
Carcinoma complexo	3	10,0%
Carcinoma mucinoso	1	3,3%
Carcinoma sólido	3	10,0%
Carcinoma tubular	4	13,4%
Carcinoma em tumor misto	8	26,7%
Carcinossarcoma	3	10,0%
Total	30	100,0%

FA- frequência absoluta; FR- frequência relativa.

Quanto às dosagens séricas do marcador CA 15.3, não foi encontrada diferença estatística entre os valores séricos quando comparadas as médias de cadelas portadoras de neoplasias e de cadelas hígdas, ou tampouco quando comparados os demais grupos entre si (estadiamento clínico, tempo de evolução e

presença de ulceração e vascularização), como pode ser observado nas Tab. 3, 4, 5, 6 e 7.

Tabela 3. Comparação entre os resultados das variáveis analisadas pelo tipo de tumor

Grupo	CA 15.3 ^(a) (U/mL)
Maligno	19,75
Benigno	17,50
Controle	17,50
Valor P	0,276

^(a) Comparação entre os *ranks* médios pelo teste de Kruskal-Wallis; ^(*) diferença significativa ao nível de 5%.

Tabela 4. Comparação entre os *ranks* médios dos resultados das variáveis analisadas pelo estadiamento

Estadiamento	CA 15.3 (U/mL)
I	23,50
II	17,50
III	17,50
IV	22,00
Controle	17,50
Valor P ^(A)	0,068

^(A) Comparação entre os *ranks* médios pelo teste de Kruskal-Wallis; ^{*} diferença significativa ao nível de 5%.

Tabela 5. Comparação entre os *ranks* médios dos resultados das variáveis analisadas pelo tempo de evolução

Tempo de evolução	CA 15.3 (U/mL)
< 6 meses	17,50
6 a 12 meses	20,07
> 12 meses	19,30
Controle	17,50
Valor P ^(A)	0,486

^(A) Comparação entre os *ranks* médios pelo teste de Kruskal-Wallis; ^{*} diferença significativa ao nível de 5%.

Tabela 6. Comparação entre os *ranks* médios dos resultados das variáveis analisadas pela presença de úlceras

Ulceração	CA 15.3(U/mL)
Sim	22,00
Não	18,63
Controle	17,50
Valor P ^(A)	0,155

^(A) Comparação entre os *ranks* médios pelo teste de Mann-Whitney; ^{*} diferença significativa ao nível de 5%.

Tabela 7. Comparação entre os *ranks* médios dos resultados das variáveis analisadas pela vascularização

Vascularização	CA 15.3(U/mL)
Sim	17,50
Não	19,90
Controle	17,50
Valor P ^(A)	0,237

^(A) Comparação entre os *ranks* médios pelo teste de Mann-Whitney; ^{*} diferença significativa ao nível de 5%.

A maioria dos resultados encontrados para dosagem sérica de CA 15.3, seja para cadelas portadoras de neoplasias, seja para cadelas híginas, foi equivalente a zero. De acordo com Jacobs e Haskell (1991), mesmo quando não é possível realizar a dosagem do marcador, a presença de metástases não pode ser descartada. Convém lembrar também que o limiar de detecção do *kit* utilizado é 0,5U/mL. Uma das possíveis hipóteses para tal resultado pode ser em razão de os níveis dos marcadores estarem abaixo do limiar de detecção do *kit* utilizado. Resultado semelhante foi observado por Jardini (2003), que, utilizando-se do método de quimioluminescência, não conseguiu realizar a dosagem sérica do marcador CA 15.3 em cadelas híginas e portadoras de neoplasias mamárias, atribuindo a falha à não produção da proteína pelos tipos histológicos estudados, ou à produção sem liberação da proteína na circulação, ou ainda à existência de diferenças estruturais que inviabilizem a utilização do *kit* para humanos.

Entretanto, tal argumento pode ser contestado pelos resultados encontrados por outros autores. Manuali *et al.* (2012) verificaram expressão tecidual de CA 15.3 em 68% das cadelas portadoras de neoplasias malignas e correlacionaram positivamente esse achado com o grau histológico de malignidade.

Já Bicalho (2012) somente conseguiu realizar a dosagem de CA 15.3 em cadelas híginas por meio do método de quimioluminescência após a realização de um processo de concentração de proteínas no soro das cadelas avaliadas, atribuindo a falha também ao limiar de detecção do *kit* utilizado. Após o processo de concentração, foi possível detectar o marcador no soro, concluindo-se que é viável a utilização do *kit* para detecção do marcador em cadelas.

Dosagem sérica do...

De acordo com Marchesi *et al.* (2010), a quimioluminescência é uma técnica sensível, de fácil execução e baixo custo, o que torna o *kit* de reagentes desenvolvido para humanos viável para utilização em cães. Contudo, os resultados mostram que não foi possível realizar a dosagem do marcador por meio da referida técnica, provavelmente devido ao fato de os níveis séricos do marcador estarem abaixo do limiar de detecção do *kit*, assim como observado por Bicalho (2012).

Campos *et al.* (2012), em seu estudo, ao compararem cadelas hígdas e cadelas com e sem metástase a distância portadoras de neoplasias mamárias, mediante a utilização do teste ELISA, observaram que as concentrações séricas de CA 15.3 foram mais elevadas conforme o estadiamento clínico da doença. Resultado semelhante foi observado por Gelaleti (2011), que, utilizando o teste ELISA, verificou que altos níveis séricos do CA 15.3 tiveram relação com a rápida evolução tumoral e menor sobrevida das cadelas, inferindo, assim, seu possível uso como marcador de pior prognóstico também na espécie canina.

Apesar da possibilidade de utilização do marcador CA 15.3, ainda não se têm

estabelecidos, na medicina veterinária, valores normais séricos, e os estudos para avaliação do prognóstico e acompanhamento de cadelas portadoras de neoplasias mamárias ainda são inconsistentes, sendo necessária melhor padronização da técnica, bem como melhor investigação do significado clínico da detecção do marcador em cães.

Conclui-se que a dosagem do marcador CA 15.3 por meio do método de eletroquimioluminescência, utilizando-se *kits* comerciais formulados para dosagens humanas, não ofereceu resultados significativos que tornassem possível a utilização do método ou do marcador como ferramenta para acompanhamento e avaliação do prognóstico de cadelas portadoras de neoplasias mamárias. Contudo, dosagens de testes séricos são procedimentos pouco invasivos, relativamente práticos, financeiramente viáveis e possibilitam o acompanhamento da paciente com a realização de coletas periódicas, o que torna esse tipo de estudo bastante promissor.

Palavras-chave: cadela, antígeno 15.3 ao cancer, tumor mamário

ABSTRACT

The objective of the present study was to analyze the serum levels of the tumor marker Ca15.3 in healthy bitches and those with mammary neoplasms, correlating results with tumor type, clinical staging, time until presentation, and presence of ulceration and vascularization. For the study, 30 bitches with mammary tumors and 30 healthy bitches (control group) were selected. Histopathology was performed for identification of tumor type, and blood was collected for measurement of serum concentration of the marker via the chemiluminescence method using a commercial kit. A higher frequency of malignant neoplasms was observed (76.7%), with a higher quantity of carcinoma in mixed tumor (26.7%). Regarding serum concentration of the marker Ca15.3, there was no difference in serum values when comparing the means from bitches with neoplasia and healthy bitches, nor when comparing the other characteristics. The majority of results for serum concentration of Ca15.3, whether in bitches with neoplasia or in healthy bitches, was zero. It is concluded that the measurement of the marker Ca15.3 using the chemiluminescence method and commercial kits for humans did not offer significant results that would make this method or this marker a useful tool for patient monitoring and evaluation of the prognosis of bitches with mammary neoplasms.

Keywords: female dogs, cancer antigen 15.3, mammary tumors

REFERÊNCIAS

- BICALHO, S.R. *Quantificação sérica do marcador tumoral CA15.3 em cadelas híidas por quimioluminescência*. 2012. 28f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP.
- CAMPOS, L.C.; LAVALLE, G.E.; ESTRELA-LIMA, A. *et al.* CA 15.3, CEA, and LH in dogs with malignant mammary tumors. *J. Vet. Int. Med.*, v.26, p.1383-1388, 2012.
- CASSALI, G.G.; 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, p.38-69, 2014.
- GELALETI, G.B. *Avaliação da interleucinas 8 e 12, do CA 15-3 e DNA livre circulante como marcadores prognósticos no soro sanguíneo de cadelas com neoplasia mamária*. Dissertação (Mestrado em Genética). 2011. 100f. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho Jaboticabal, SP.
- JACOBS, E.L.; HASKELL, C.M. Clinical use of tumor markers in oncology. *Cur. Probl. Cancer*, v.15, p.299-360, 1991.
- JARDINI, F.H.M. *Avaliação dos marcadores CEA e CA15-3 no soro e CEA no tumor e linfonodos excisados de cadelas portadoras de neoplasias mamárias*. 2003. 41f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- MANUALI, E.; GIUSEPPE, A.; FELIZIANI, F. *et al.* CA 15-3 cell lines and tissue expression in canine mammary cancer and the correlation between serum levels and tumour histological grade. *BMC Vet. Res.*, v.8, p.246-261, 2012.
- MARCHESI, M.C.; MANUALI, E.; PACIFICO, E. *et al.* Cancer antigen 15/3: possible diagnostic use in veterinary clinical oncology. Preliminary study. *Vet. Res. Commun.*, v.34, p.S103-S106, 2010.
- MIDSORP, W. Tumors of the mamary gland. In: MEUTEN, D.J. *Tumors in domestic animals*. 4.ed. Iowa: Iowa State Press, 2002. cap.12, p.575-606.
- OLIVEIRA FILHO, J.C.; KOMMERS, G.D.; MASUDA, E.K. *et al.* Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.30, p.177-185, 2010.
- OLIVEIRA, L.O.; OLIVEIRA, R.T.; LORETTI, L.P.; RODRIGUES, R.P.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Sci Vet.* v.31, n.2, p. 105-110, 2003.
- QUEIROGA F.; LOPES C. Tumores mamários caninos: novas perspectivas. *Anais do Congresso de Ciências Veterinárias*, p.183-190, 2002.
- RAMOS, R.S.; AVANSI, B.R.; VOLPATO, R. *et al.* Expressão gênica dos RE α , RE β , e PR em tumores mamários de cadelas por meio do q-PCR. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, p.1471-1477, 2012.
- SOUZA, J.V. Marcadores mucinosos associados ao câncer. *Revista Assoc. Med. Rio Grande Sul*, v.46, p.70-83, 2002.