ERIKA DE BRITO MARCO ZANUTO

**Estudo crítico, termográfico e terapêutico dos tumores circum-anais e dos
adenocarcinomas apócrinos de saco anal caninos**

São Paulo

2020

ERIKA DE BRITO MARCO ZANUTO

**Estudo crítico, termográfico e terapêutico dos tumores circum-anais e dos
adenocarcinomas apócrinos de saco anal caninos**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação
em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Departamento Cirurgia

Área de Concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof.^a Dr.^a Julia Maria Matera

São Paulo

2020

Total or partial reproduction of this work is permitted for academic purposes with the proper attribution of authorship and ownership of the rights.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3961
FMVZ

Zanuto, Erika de Brito Marco

Estudo crítico, termográfico e terapêutico dos tumores circum-anaís e dos adenocarcinomas apócrinos de saco anal caninos / Erika de Brito Marco Zanuto. – 2020.

126 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Julia Maria Matera.

1. Oncologia. 2. Cães. 3. Períneo. 4. Quimioterapia metronômica. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da Incidência e dos Aspectos Clínico Cirúrgico, Citológico, Histopatológico, Termográfico e Terapêutico dos Tumores Perianais Caninos", protocolada sob o CEUA nº 3684020715 (ID 001798), sob a responsabilidade de **Julia Maria Matera e equipe; Erika de Brito Marco Zanuto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/11/2015.

We certify that the proposal "Evaluation of the Impacts and Aspects of Clinical, Surgical, Cytological, Histopathological, Thermography and Therapeutic of Canine Perianal Tumors", utilizing 20 Dogs (20 males), protocol number CEUA 3684020715 (ID 001798), under the responsibility of **Julia Maria Matera and team; Erika de Brito Marco Zanuto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 11/17/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **09/2015** a **09/2017**

Área: **Cirurgia**

Origem: **HOVET/FMVZ/USP**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos**

idade: **a**

N: **20**

Linhagem: **N/A**

Peso: **a**

Local do experimento:

São Paulo, 14 de março de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ZANUTO, Erika de Brito Marco

Título: **Estudo crítico, termográfico e terapêutico dos tumores circum-anais e dos tumores apócrinos de saco anal caninos**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Joana e Edson (in memoriam). Sem vocês, jamais teria chegado até aqui, pois vocês sempre se esforçaram ao máximo para me dar o melhor. Sempre acreditaram em mim. E principalmente, obrigada por me ensinarem o significado da palavra empatia, ela sempre fará diferença em minha vida.

Amo vocês.

Ao meu amado, Gustavo, que me ensinou o que é amar de verdade. Você é incrível, uma das pessoas que mais admiro no mundo. Obrigada por dividir seus sonhos e sua vida comigo.

Te amo mais.

Aos meus estimados irmãos Fábio e Elaine, que sempre torceram por mim e vibraram com cada vitória. Essa tese também é de vocês.

Amo vocês.

Aos meus e a todos os animais, pacientes ou não, que sempre alegraram o meu coração e coloriram minha vida. Gostaria de ter salvado a todos, mas fiz e farei o meu melhor a cada um de vocês sempre.

“Seja a mudança que você quer ver no mundo”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^ª Dr^a Julia Maria Matera, um exemplo a ser seguido. Uma profissional competente e criativa, uma pessoa ética e amorosa. Obrigada por me acompanhar ao longo desses 10 anos, e participar ativamente da minha evolução como médica veterinária e ser humano.

Aos meus amigos e companheiros de pós-graduação, Eric Vieira, Samanta Modesto, Bruna Miranda, Cláudia de Souza e Sebastian Aristizabal foram muitas emoções ao longo desses 4 anos. Obrigada por todo apoio de vocês.

À médica veterinária Maria Luiza Franchini por gentilmente ter realizado os exames citológicos deste projeto sem custo aos tutores. Obrigada por seu empenho e contribuição a este projeto.

Às médicas veterinárias do Serviço de Cirurgia e Anestesia de Pequenos Animais, Ayne Hayashi, Andressa Nitrini, Patrícia de Castro, Patrícia Bonifácio Flor e Geni Patrício. Obrigada por compartilhar o conhecimento de vocês, por me ajudarem nos momentos difíceis, pelo companheirismo e amizade.

Aos queridos enfermeiros do hospital, Jesus, Lélis, Miron e Otávio. Não consigo imaginar a nossa vida sem vocês. Sentirei saudade.

Aos professores do Departamento de Cirurgia, que me acompanham desde a graduação. Obrigada por me ensinarem muito do que sei hoje. Especialmente a Prof^ª Dr^a Aline Magalhães Ambrósio, Prof^ª Dr^a Denise Fantoni, Prof^ª Dr^a Sílvia Renata Gaido Cortopassi, Prof^ª Dr^a Carla Aparecida Batista Lorigados, Prof^ª Dr^a Ana Carolina Brandão de Campos Fonseca Pinto.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Lapmol), em especial ao Prof. Bruno Cogliati, e as pós graduandas Teresa e Bruna pela realização das reações e leitura da imuno-histoquímica do projeto.

Aos secretários da pós-graduação Belarmino Ney Pereira e Livia Gimenes, por toda ajuda nos momentos mais difíceis, por toda amizade, por todo empenho.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, minha segunda casa. Muito orgulho de ter feito parte desta história.

Aos proprietários que colaboraram com essa pesquisa, pela dedicação e confiança em nosso trabalho. Muito obrigada.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

RESUMO

ZANUTO, E. B. M. **Estudo crítico, termográfico e terapêutico dos tumores circum-anaís e dos adenocarcinomas apócrinos de saco anal caninos.** [Critical, thermographic and therapeutic study of canine circumanal glands tumours and apocrine glands anal sac adenocarcinomas]. 2020. 126 f. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Os tumores circum-anaís são frequentes em cães, sendo a terceira neoplasia cutânea mais comum da espécie. Os adenomas de glândulas circum-anaís possuem um bom prognóstico com a remoção cirúrgica associada à orquiectomia nos machos. Já os adenocarcinomas circum-anaís apresentam alta taxa de recidiva, e os adenocarcinomas apócrinos de saco anal demonstram prognóstico de reservado a ruim, são altamente invasivos e metastáticos. Ainda não existe uma terapia de escolha para esses tumores, assim como, para os adenocarcinomas circum-anaís, principalmente os metastáticos. O objetivo deste estudo é caracterizar os tumores circum-anaís e apócrinos de saco anal, avaliando parâmetros clínicos, possibilidades diagnósticas e o uso da quimioterapia metronômica, buscando dessa forma nova abordagem a essas neoplasias. 80 cães, machos e fêmeas foram divididos em três grupos, adenoma de glândula circum-anal (AGCA) com 42 animais; adenocarcinoma de glândula circum-anal (ACGCA) com 33; e o grupo adenocarcinoma apócrino de saco anal (ACASA) com cinco animais. Foi realizada a relação citológica – histopatológica, em que se obteve correlação de 81,5%. Como método diagnóstico complementar foi utilizado o estudo termográfico em 52 cães. Foram analisados os seguintes parâmetros: SpT- temperatura no ponto central da formação; SpNT - temperatura em ponto distante da formação; AT - área elipsoide abrangendo a formação; e ANT - área elipsoide em um ponto mais distante da formação. Para AGCA a diferença entre a média de SpT (35,06°C) e de SpNT (36,51°C) foi -1,45°C ($p < 0,01$) enquanto a diferença da média AT (35,47°C) e ANT (36,42°C) foi - 0,96°C ($p < 0,05$). Para ACGCA a diferença entre a média de SpT (35,17°C) e de SpNT (36,88°C) foi de -1,71°C ($p < 0,01$) ao passo que a entre AT (34,95°C) e ANT (36,57°C) foi de -1,69°C ($p < 0,01$). Comparando-se adenomas e adenocarcinomas circum-anaís a diferença SpT foi -0,10 °C ($p = 0,87$), e a diferença AT foi de 0,52° C ($p = 0,38$). Ambos os tumores são mais frios do que o esfíncter saudável, porém um número significativo de adenocarcinomas circum-anaís são mais frios que os adenomas circum-anaís, observou-se assim um aumento da probabilidade (17,45%) de ser um ACGCA toda vez que se tem uma diferença de 1°C ou mais entre o tumor e a pele saudável. Não foi possível realizar a análise

estatística do grupo ACASA por ter apenas um animal analisado. A avaliação imuno-histoquímica foi realizada em 65 cães. Para os tumores circum-anaís, a taxa de Ki-67 foi maior no grupo ACGCA e o aumento teve relação com o tamanho tumoral, mas não teve relação com presença de metástase, sobrevida e tempo livre de doença. O aumento de CD-31 teve relação com o tamanho tumoral e com a menor prevalência de metástase no momento do diagnóstico e VEGF apresentou correlação somente com o tamanho tumoral. A quimioterapia metronômica com ciclofosfamida (15mg/m²/sid) e piroxicam (0,3mg/kg/sid) foi realizada durante 6 meses nos grupos ACGCA e ACASA, sendo que só o primeiro grupo teve um grupo controle. Não houve diferença estatística em relação a tempo livre de doença e sobrevida entre os animais do grupo ACGCA que receberam (subgrupo II – 740,95 dias de sobrevida) e que não receberam a quimioterapia (subgrupo III – 546,21 dias de sobrevida). No grupo ACASA (subgrupo IV) a sobrevida foi de 534,99 dias, dados semelhantes ao encontrado em literatura. A quimioterapia metronômica teve boa aceitação, praticidade e baixo custo, com mínimos efeitos adversos, sendo um tratamento seguro a ser usado nos animais com adenocarcinomas circum-anaís e apócrinos de saco anal.

Palavras-chave: oncologia, cães, períneo, quimioterapia metronômica.

ABSTRACT

ZANUTO, E. B. M. **Critical, thermographic and therapeutic study of canine circumanal glands tumours and apocrine gland anal sac adenocarcinomas.** [Estudo crítico, termográfico e terapêutico dos tumores perianais e dos adenocarcinomas apócrinos de saco anal caninos]. 2020. 126 f. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Circumanal tumors are usually seen in dogs being the third most common skin cancer of the species. Circumanal gland adenomas have a good prognosis with surgical removal associated with orchiectomy in males. Circumanal adenocarcinomas, on the other hand, have a high rate of recurrence, and anal sac apocrine gland adenocarcinomas demonstrate a prognosis of reserved to bad, are highly invasive and metastatic. There is still no therapy of choice for these tumors, as well as for circumanal adenocarcinomas, especially metastatic ones. The objective of this study is to characterize circumanal and anal sac apocrine gland tumours, evaluating clinical parameters, diagnostic possibilities and the use of metronomic chemotherapy, thus seeking a new approach to these neoplasms. 80 dogs, males and females were divided into three groups, circum-anal gland adenoma (AGCA) with 42 animals; circum-anal gland adenocarcinoma (ACGCA) with 33; and the anal sac apocrine gland adenocarcinomas group (ACASA) with five animals. The cytological - histopathological relationship was performed, with a correlation of 81.5%. As a complementary diagnostic method, the thermographic study was used in 52 dogs. The following parameters were analyzed: SpT- temperature at the central point of the formation; SpNT - temperature in a distant point of the formation; AT - ellipsoid area covering the formation; and ANT - ellipsoid area at a more distant point from the formation. For AGCA, the difference between the mean of SpT (35.06 ° C) and SpNT (36.51 ° C) was -1.45 ° C ($p < 0.01$) while the difference of the mean AT (35, 47 ° C) and ANT (36.42 ° C) was - 0.96 ° C ($p < 0.05$). For ACGCA the difference between the mean of SpT (35.17 ° C) and SpNT (36.88 ° C) was -1.71 ° C ($p < 0.01$) whereas that between AT (34, 95 ° C) and ANT (36.57 ° C) was -1.69 ° C ($p < 0.01$). Comparing circumanal adenomas and adenocarcinomas, the SpT difference was -0.10 ° C ($p = 0.87$), and the AT difference was 0.52 ° C ($p = 0.38$). Both tumors are colder than healthy skin, but a significant number of circumanal adenocarcinomas are colder than circumanal adenomas. For each difference of 1° C between the tumor and healthy skin, there is an increased probability of 17.45% of being ACGCA. As only one animal was analyzed, it was not possible to perform the statistical analysis of the

ACASA group. The immunohistochemical evaluation was performed in 65 dogs. For circumanal tumors, the Ki-67 rate was higher in the ACGCA group and the increase was related to the tumor size, but it was not related to the presence of metastasis, survival and disease-free time. The increase in CD-31 was related to tumor size and the lower prevalence of metastasis at the time of diagnosis and VEGF correlated only with tumor size. Metronomic chemotherapy with cyclophosphamide ($15\text{mg}/\text{m}^2/\text{sid}$) and piroxicam ($0.3\text{mg}/\text{kg}/\text{sid}$) was performed for 6 months in the ACGCA and ACASA groups, with only the first group having a control group. There was no statistical difference regarding disease-free time and survival among the animals in the ACGCA group that received (subgroup II - 740.95 days of survival) and that did not receive chemotherapy (subgroup III - 546.21 days of survival). In the ACASA group (subgroup IV), survival was 534.99 days, similar to what is observed in the literature. Metronomic chemotherapy was well accepted, practical and low cost, with minimal adverse effects, being a safe treatment to be used in animals with circumanal and apocrine anal sac adenocarcinomas.

Keywords: oncology, dogs, perineum, metronomic chemotherapy

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ACASA	Adenocarcinoma apócrino de saco anal
ACGCA	Adenocarcinoma de glândula circum-anal
AGCA	Adenoma de glândula circum-anal
ALT	Alanina transferase
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANT	Área elipsoide em tecido sadio
AT	Área elipsoide abrangendo a formação
CD – 31	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária 1
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COX – 2	Cicloxigenase 2
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GIST	<i>Gastrintestinal stromal tumor</i> – Tumor estromal gastrintestinal
HOVET	Hospital Veterinário
Ht	Hematócrito
Ki – 67	Antígeno Ki-67
Lapmol	Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Patologia da FMVZ (Lapmol)
OMS	Organização Mundial de Saúde
RM	Ressonância magnética
SpNT	Temperatura em ponto distante da formação
SpT	Temperatura do ponto central da formação
TC	Tomografia computadorizada
USP	Universidade de São Paulo
VCOG - CTCA	Veterinary Cooperative Oncology Group
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> – fator de crescimento endotelial vascular
WHO	World Healthy Association

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 ANATOMIA E HISTOLOGIA PERIANAL E LINFONODOS	19
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	20
2.3 APRESENTAÇÃO E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	22
2.4 DIAGNÓSTICO	23
2.4.1 Punção aspirativa por agulha fina (PAAF).....	23
2.4.2 Exames Laboratoriais	24
2.4.3 Exames de imagem	24
2.4.3.1 Termografia	26
2.4.4 Exame Histopatológico Tumoral e Testicular.....	28
2.4.5 Imuno-histoquímica.....	30
2.5 ESTADIAMENTO CLÍNICO.....	31
2.6. TRATAMENTO.....	33
2.6.1 Modalidades terapêuticas	33
2.6.2 Quimioterapia	35
2.6.2.1 Quimioterapia convencional (Máxima dose tolerada).....	35
2.6.2.2 Quimioterapia Metronômica.....	36
2.7. PROGNÓSTICO	41
3 OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1 ESTUDO CLÍNICO - CIRÚRGICO.....	46
4.2 ESTUDO LABORATORIAL – CÁLCIO IÔNICO	48
4.3 ESTUDO CITOLÓGICO-HISTOPATOLÓGICO	48
4.4 EXAMES DE IMAGEM (ULTRASSONOGRAFIA, RADIOGRAFIA TORÁCICA E TOMOGRAFIA)	49
4.5 EXAME TERMOGRÁFICO	49
4.6 EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	50
4.6.1 Reação imuno-histoquímica.....	50

4.6.2 Avaliação imuno-histoquímica	52
4.7 QUIMIOTERAPIA METRONÔMICA	53
4.8 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE QUIMIOTERÁPICA.....	53
5 RESULTADOS	55
5.1 ESTUDO CLÍNICO - CIRÚRGICO.....	55
5.2 ESTUDO CITOLÓGICO - HISTOPATOLÓGICO	62
5.3 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO TESTICULAR.....	66
5.4 AVALIAÇÃO DO CÁLCIO IÔNICO.....	67
5.5 AVALIAÇÃO EXAMES DE IMAGEM (ULTRASSONOGRAFIA, RADIOGRAFIA E TOMOGRAFIA)	68
5.6 EXAME TERMOGRÁFICO	71
5.7 EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	76
5.8 AVALIAÇÃO DA TERAPIA.....	84
5.9 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE QUIMIOTERÁPICA.....	87
6 DISCUSSÃO	90
7 CONCLUSÕES.....	107
8 REFERÊNCIAS.....	109
9 ANEXOS.....	125

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os tumores circum-anaís, também chamados de perianais ou hepatóides são formações cutâneas de elevada frequência na população canina, sendo a sua maioria tumores benignos, no entanto, os estudos de prevalência possuem alta variabilidade indicando que alguns aspectos dessas neoplasias ainda precisam ser analisados (KIMURA, GÁRATE, DAGLI, 2012, ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, 2013; VICENTE, PERALES, TABACCHI, 2015; TOSTES et al., 2017) bem como métodos de diagnóstico e protocolos terapêuticos. Os adenocarcinomas apócrinos de saco anal possuem grande interesse científico por se tratar de uma neoplasia de comportamento geralmente agressivo, porém bastante heterogêneo em relação a prognóstico (TUREK, WITHROW, 2013, PADGETT, GAMBLIN, 2015). Ainda não existe uma terapia de escolha para esses tumores, assim como, para os adenocarcinomas perianais, principalmente os metastáticos. Um melhor entendimento clínico, diagnóstico, histopatológico e imuno-histoquímico podem melhorar a compreensão dessas afecções e, por consequência, o tratamento e prognóstico do paciente.

A remoção cirúrgica é a principal linha de tratamento para os tumores circum-anaís e apócrinos de saco anal (DOW et al., 1988), dessa forma para uma aplicabilidade correta da técnica cirúrgica é desejável que o cirurgião saiba o tipo tumoral previamente à cirurgia, já que neoplasias malignas necessitam de margens mais amplas. Neste contexto, ao mesmo tempo que se deseja a maior margem possível, diminuindo desse modo o índice de recidivas, tenta-se manter a função de contração do esfíncter anal externo para evitar a incontinência fecal permanente. Assim sendo, pesquisas envolvendo meios de diagnóstico complementares são consideráveis e passíveis de estudo.

A termografia é um método de diagnóstico que se baseia na captação de imagens infravermelhas que detectam a temperatura da superfície tecidual (WEERD et al., 2011) e se baseia no princípio que em tumores ocorre aumento do fluxo sanguíneo na área tumoral e adjacente, aumento da angiogênese e da taxa metabólica, com isso há uma alteração de temperatura desses tecidos neoplásicos quando comparados aos normais (NOWAKOWSKI, et al., 2006). O exame é bem difundido em medicina, e utilizado para vários fins diferentes, na área da oncologia atua principalmente no diagnóstico complementar de tumores mamários (POLJAK-BLAZI et al., 2009, ARAÚJO et al., 2014; PAVELSKI et al., 2015; KANDLIKAR,

et al., 2017). A termografia pode ser um método complementar ao exame citológico nos tumores circum-anaís e apócrinos do saco anal.

Ainda no âmbito de diagnóstico, destaca-se o emprego da imuno-histoquímica para auxiliar a diferenciação de benignidade e malignidade, mas também para contribuir em prognóstico e correlações clínicas (GANGULY; WOLFE, 2006; PEREIRA et al., 2013, WASQUES, 2018). A confecção de um painel imuno-histoquímico para os tumores perianais, e em especial para os adenocarcinomas apócrinos de saco anal, tem papel importante na decisão de protocolo de tratamento, tanto na duração quanto escolha do fármaco, visto que esses tumores possuem comportamento heterogêneo (BENNETT et al., 2002; WILLIAMS et al., 2003; TUREK, WITHROW, 2013).

Visando novas possibilidades de tratamento, em razão de não haver uma terapia consagrada de escolha, sobretudo para adenocarcinomas apócrinos de saco anal, e com o advento da quimioterapia metronômica, novos estudos foram surgindo com o tema. Porém em pesquisas iniciais não foi observada uma padronização, sendo os trabalhos com tumores perianais e apócrinos de saco anal escassos e pouco conclusivos (TRIPP et al., 2011; MARCHETTI et al., 2012; ELLIOTT et al., 2019; HEATPN et al., 2020). Gaspar et al (2018) citam a dificuldade de padronização dos estudos metronômicos, o que prejudica a reprodutibilidade de resultados. A quimioterapia metronômica consiste no uso de quimioterápicos em doses mais baixas que as convencionais, em intervalos menores e ininterruptos (HANAHAHAN, 2000; KERBEL, KAMEN, 2004; MAITI, 2014). Há indícios que a quimioterapia em intervalos mais curtos propicie uma probabilidade menor de resistência aos quimioterápicos, pois inibe o crescimento de novas células tumorais continuamente (HANAHAHAN, 2000). As vantagens desse tratamento incluem: poucos efeitos colaterais, baixo custo, praticidade de administração, reduzido potencial de desenvolvimento de resistência aos fármacos, efeito antiangiogênico e imunoestimulatório (HANAHAHAN, 2000).

Sendo assim, pretende-se neste estudo caracterizar os tumores perianais e apócrinos de saco anal, avaliando parâmetros clínicos, possibilidades diagnósticas e o uso da terapia metronômica, buscando dessa forma nova abordagem a essas neoplasias.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANATOMIA E HISTOLOGIA PERIANAL E LINFONODOS

A região perianal canina possui diferentes tipos de glândulas, sendo as mais importantes as glândulas circum-anais e as glândulas apócrinas dos sacos anais (DYCE, SACK, WENSING, 2010).

As glândulas circum-anais são consideradas glândulas sebáceas modificadas, lobuladas e não secretórias, não possuindo ductos (EVANS, LAHUNTA, 2013). Foram descritas pela primeira vez em 1923 em carnívoros e bovinos (BLAZQUEZ, 1988; SHABADASH, ZELIKINA, 2002).

Estão presentes desde o nascimento e continuam crescendo durante a vida estimuladas por hormônios andrógenos (DYCE, SACK, WENSIN, 2010). Histologicamente, são classificadas em dois tipos, as células basais e as diferenciadas. As células basais são achatadas e circundam a glândula, enquanto as diferenciadas são poligonais e mais numerosas. Ambas são compostas por uma porção sebácea e outra não-sebácea (EVANS, LAHUNTA, 2013).

As glândulas circum-anais, também são conhecidas como hepatóides, devido ao seu formato similar a hepatócitos, estando presentes em maior quantidade ao redor do ânus na zona cutânea, e na base da cauda. Encontram-se também em escroto, prepúcio, membros pélvicos e em linha média ventral e dorsal, se estendendo do crânio até o umbigo (EURELL, FRAPPIER, 2012).

As glândulas do saco anal são glândulas sudoríparas apócrinas modificadas que drenam seu conteúdo para um divertículo anal denominado de saco anal, também chamado de seio paranal (EURELL, FRAPPIER, 2012). Os sacos anais se localizam na região perianal, bilateralmente ao ânus, entre o esfíncter anal interno e o externo (EVANS, LAHUNTA, 2013).

Cada saco se comunica com a superfície da pele por um ducto individual que culmina na extremidade cranial na zona cutânea interna do ânus adjacente à linha anocutânea e à zona intermediária, são revestidos por epitélio escamoso estratificado e possuem formato circular, medindo aproximadamente 1cm de diâmetro cada um. Sua secreção é untuosa e acastanhada, e acredita-se que atuam no reconhecimento social dos cães (DYCE, SACK, WENSING, 2010; EURELL, FRAPPIER, 2012). Os sacos anais estão presentes em determinados carnívoros

(fissípedes, com exceção dos ursos) e em muitos roedores (BACHA, 2000; GOLDSHIMIDT, 2002; DYCE, SACK, WENSING, 2010).

Além das glândulas circum-anais e apócrinas do saco anal, a região perianal possui outras estruturas importantes como as glândulas anais, que são estruturas tubuloalveolares, localizadas próximas às glândulas circum-anais, os esfíncteres anais interno e externo, musculatura lisa do reto, tecido adiposo, musculatura da região perineal, derme, epiderme, e intensa vascularização sanguínea que irriga toda a área (BACHA, 2000).

A região perianal e pélvica é drenada pelos linfonodos sacrais, ilíacos internos e ilíacos mediais que em conjunto formam o linfocentro iliosacral (EVANS, LAHUNTA, 2013). Os linfonodos sacrais são os mais caudais, localizando-se abaixo do osso sacro e ao lado das artérias sacrais. Os linfonodos ilíacos internos encontram-se entre a artéria ilíaca interna e a artéria sacral mediana, ventral a sexta ou sétima vértebra lombar. Os linfonodos ilíacos mediais são os mais craniais, maiores e de mais fácil acesso para diagnóstico e remoção, estão situados na bifurcação das artérias circunflexa caudal e ilíacas externas, adjacente à aorta e veia cava (EVANS, LAHUNTA, 2013).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Os tumores circum-anais, segundo Moulton (1990) ocupam o terceiro lugar em incidência quando comparados a todos os tumores de pele dos cães, menos frequente apenas que os mastocitomas e as neoplasias mamárias. Em outros levantamentos estima-se que representam de 5,8 a 13,5% das formações cutâneas em cães (FINNIE, BOSTOCK, 1979; GOLDSMITH, SHOFR, 1992; KALDRYMIDOU et al, 2002).

Os estudos de incidência e prevalência para os tumores perianais apresentam elevada variância de proporções entre adenomas, adenocarcinomas e epiteliomas, sendo os adenomas de glândulas circum-anais os mais frequentes, representando entre 46% a 96% dos tumores perianais. Seguidos pelos adenocarcinomas de glândulas circum-anais representando entre três a 54% (NIELSEN, ATTOSMIS, 1964; BERROCAL et al., 1989; SOUZA et al., 2006; KIMURA; GÁRATE; DAGLI, 2012; ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, 2013; VICENTE, PERALES; TABACCHI, 2015; TOSTES et al., 2017). E os adenocarcinomas de glândulas apócrinas do saco anal representam cerca de 17% dos tumores malignos da região, e menos de

2% de todos os tumores de pele dos cães (BERROCAL, 1989; ROSS et al., 1991). Em um estudo com cães brasileiros Assunção (2003) observou que dos tumores perianais excisados na região, 42,85% eram benignos e 52,38% eram malignos.

As raças mais acometidas pelos tumores circum-anais são: Cocker Spaniel, Beagle, Bulldog, Samoieda, Poodle, Husky Siberiano e Lhasa Apso. Em dois estudos detectou-se que os adenocarcinomas de glândulas circum-anais foram mais comuns em raças de grande porte (VAIL et al., 1990; ASSUNÇÃO, 2003).

Os adenomas de glândula circum-anal ocorrem mais frequentemente em machos idosos, por volta de 10 anos, e não castrados. Existe uma relação positiva deste tipo tumoral com hormônios androgênicos. Estudos também evidenciam a correlação entre tumores de células intersticiais testiculares com adenomas perianais (WILSON, HAYES, 1979). Fêmeas castradas possuem maior probabilidade de desenvolvido desse tipo tumoral, possivelmente pelo aumento de hormônios androgênicos (DOW et al., 1988), esses tumores também podem apresentar receptores estrogênicos (ELLING, et al., 1980). Porém raramente os adenomas circum-anais podem ser estimulados por tumores em adrenais produtores de testosterona (HILL, 2005).

Os adenocarcinomas de glândulas circum-anais e epitelomas podem acometer machos ou fêmeas, castrados ou não, sendo a idade média do aparecimento tumoral de 11 anos. Os adenocarcinomas circum-anais podem ser classificados como: bem, moderadamente ou pouco diferenciados, dependendo do grau de malignidade (BERROCAL et al., 1989; GOLDSCHMIDT, GOLDSCHMIDT, 2016). A relação hormonal presente nos adenomas, não está bem elucidada nos adenocarcinomas, não sendo indicada a orquiectomia como tratamento único (ARONSON, 2003). Pisani et al. (2006) em seus estudos demonstraram que os adenocarcinomas também possuem receptores androgênicos, justificando desta forma a orquiectomia como tratamento adjuvante à remoção tumoral.

Os adenocarcinomas apócrinos de saco anal não respondem à castração. Machos e fêmeas possuem a mesma predisposição, e a idade média de aparecimento desse tumor é entre 9 e 11 anos. Porém, há relatos de animais pouco mais jovens. Os tumores benignos apócrinos de saco anal são muito raros, porém já descritos (GOLDSCHMIDT; ZOLTOWSKI, 1981; BENNETT, et al., 2002; WILLIANS et al., 2003; SIMEONOV; SIMEONOVA, 2008; BARNES; DEMETRIOU, 2017; SKORUPSKI, et al., 2018; ELLIOT, 2019).

2.3 APRESENTAÇÃO E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Os adenomas de glândulas circum-anaís podem ser únicos ou múltiplos, geralmente pequenos, pedunculados, firmes, bem circunscritos e não aderidos a planos adjacentes. Porém podem se tornar grandes e ulcerados. O crescimento é lento, e localizam-se mais frequentemente ao redor do ânus, mas podem se distribuir por todas as regiões aonde há glândulas circum-anaís (TUREK, WITHROW, 2013).

Os adenocarcinomas de glândulas circum-anaís podem se assemelhar aos adenomas, porém possuem um crescimento mais rápido, geralmente são solitários, ulcerados e localmente invasivos. As metástases usualmente ocorrem em linfonodos intrapélvicos e sublobares, incluindo ilíacos, aórticos, hipogástricos e sacrais, mas também podem acometer fígado, pulmões, rins, baço e ossos (TUREK, WITHROW, 2013; FOSSUM, 2015; MCCOURT et al., 2018). A frequência de metástase nos adenocarcinomas perianais varia em torno de 8 a 20% (TUREK, WITHROW, 2013).

Os adenocarcinomas de glândulas do saco anal mostram-se, em geral, unilateralmente, mas podem ser bilaterais em 6,6 a 10% dos casos (EMMS, 2005; TUREK, WITHROW, 2013). Possuem crescimento relativamente lento, porém frequente e precocemente ocorre invasão dos tecidos adjacentes (reto e canal pélvico). São tumores potencialmente metastáticos, estudos demonstram que em 36 a 96% (WILLIAMS et al., 2003; TUREK, WITHROW, 2013) e em 21 a 79% (ROSS et al., 1991; POTANAS, PADGETT, GAMBLIN, 2015) dos casos são identificadas metástases no momento do diagnóstico, mesmo em formações de tamanho reduzido. Estas metástases ocorrem, assim como, nos adenocarcinomas circum-anaís, em linfonodos intrapélvicos, pulmões, fígado e baço, metástases ósseas são menos comuns, e mais raramente em coração, rins, pâncreas e adrenais (BENNETT et al., 2002; WILLIAMS et al., 2003).

Disquezia e tenesmo são frequentes nos adenocarcinomas apócrinos de saco anal devido ao aumento de linfonodos intrapélvicos e sublobares, ulceração e sangramentos locais são usualmente descritos (TUREK, WITHROW, 2013).

A hipercalcemia pode estar presente como síndrome paraneoplásica nos adenocarcinomas de glândula apócrina do saco anal, isto porque, uma proteína relacionada ao paratormônio é sintetizada pelas células tumorais (GRONE et al., 1994; WILLIAMS et al., 2003; MESSINGER et al., 2010; BERGMAN, 2012). O paratormônio no organismo é

responsável pelo controle de cálcio no sangue e nos fluidos extracelulares, estimulando a reabsorção de cálcio quando seus níveis no sangue se encontram baixos, inibindo a reabsorção de fosfato pelo rim, estimulando a síntese da forma ativa da vitamina D no rim e a reabsorção óssea. Como resultado, ocorre aumento da concentração sérica de cálcio ionizado e a diminuição de fosfato. A hipercalcemia pode causar êmese, anorexia, letargia, poliúria e polidipsia (NELSON, 2010).

2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico das neoplasias perianais deve ser realizado por meio de anamnese, exame clínico e exames complementares. O toque retal deve ser realizado para se identificar comprometimento e o grau de invasão tumoral (FOSSUM, 2015).

2.4.1 Punção aspirativa por agulha fina (PAAF)

O exame citológico por punção aspirativa dos tumores perianais para diferenciação de adenomas e adenocarcinomas não tem se mostrado muito conclusiva, porém, pode ser de extrema importância para distinguir outros tipos tumorais, como por exemplo, mastocitomas e linfomas cutâneos, assim como processos inflamatórios locais (STANNARD, PULLEY, 1978). Em contraposição ao descrito anteriormente, Assunção (2003) e Yumuşak, Çalışkan, Kutsal (2016) demonstraram em seus estudos que a citologia aspirativa por agulha fina é um bom método de diagnóstico dos tumores perianais, possuindo correlação diagnóstica de 90% e 84,37% com o exame histopatológico, respectivamente.

A citologia mostra-se importante para diferenciação de alterações benignas e malignas em órgãos abdominais e linfonodos (DE SWARTE et al., 2011). É possível a realização de punção aspirativa guiada por ultrassonografia em fígado, baço, rins e em outras estruturas da cavidade como linfonodos ilíacos mediais, porém em linfonodos ilíacos internos torna-se dificultosa, devido, a localização anatômica caudal e próxima a vasos importantes. A punção

guiada dos linfonodos sacrais se torna impossível, pois estes estão localizados abaixo dos ossos da pelve (ANDERSON et al., 2013).

2.4.2 Exames laboratoriais

Hemograma completo, perfil renal e perfil hepático são importantes para o planejamento cirúrgico e tratamento quimioterápico, caso seja necessário posteriormente. Além disso, os exames hematológicos e bioquímicos também são importantes para detectar síndromes paraneoplásicas (TUREK, WITHROW, 2013). A análise de cálcio iônico é necessária devido à hipercalcemia que os adenocarcinomas apócrinos do saco anal podem provocar (GRONE et al., 1994; WILLIAMS et al., 2003; MESSINGER et al., 2010; BERGMAN, 2012). Pacientes com hipercalcemia podem apresentar degeneração tubular moderada e multifocal, gerando uma nefrite intersticial, a deposição de cálcio pode predispor também a nefrolitíase e a nefrocalcinose, essas alterações podem ocasionar uma insuficiência renal aguda ou crônica (BUSH et al. 2004). Mesmo com essas alterações renais, a creatinina sérica pode se encontrar em níveis normais, já que para haver uma azotemia renal é necessária a perda de mais de 50% da função renal. Outras síndromes paraneoplásicas como anemia, trombocitopenia e leucocitose são consideradas incomuns (TUREK, WITHROW, 2013).

2.4.3 Exames de imagem

O diagnóstico por imagem tem se mostrado cada vez mais importante na medicina veterinária, e principalmente na oncologia, pois é um instrumento fundamental não apenas para diagnóstico, mas também para estadiamento, acompanhamento e planejamento do tratamento do paciente oncológico (LORIGADOS et al., 2013).

A radiografia torácica deve ser realizada em todos os pacientes com adenocarcinomas circum-anaís para a análise de pulmão e mediastino. As metástases nestes locais são consideradas raras, porém podem ocorrer, principalmente, em forma de nódulos, únicos ou múltiplos (HOELZLER et al., 2001).

A ultrassonografia abdominal é utilizada para identificação de alterações em estruturas como testículos, fígado, baço e linfonodos. Outros órgãos como, pâncreas, adrenais e rins podem apresentar lesões metastáticas, porém com menor frequência. Neste exame se avalia a ecogenicidade dos órgãos, tamanho, formato, presença ou ausência de nódulos. A avaliação dos órgãos abdominais permite o estadiamento da doença e interfere diretamente no tratamento e no prognóstico do paciente (LABRES-DIAZ et al., 2004; MAYER, 2010).

A análise dos linfonodos sacrais, ilíacos internos e ilíacos mediais têm se mostrado importante na escolha terapêutica e no prognóstico, isto porque, pacientes que não apresentam alterações nesses linfonodos possuem sobrevida maior em relação aos que possuem metástases nessas estruturas (WILLIAMS et al., 2003). Linfonodos considerados normais têm tamanho padrão para o porte do animal, formato fusiforme, ecotextura e ecogenicidade homogêneas. Linfonodos alterados, tanto por doenças benignas como malignas denotam diversas modificações, como aumento de tamanho, heterogenicidade, alteração de ecotextura e diminuição ecogenicidade, podendo também se tornar irregulares (LABRES-DIAZ et al., 2004; MAYER, 2010).

Em medicina, a tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) são rotineiramente utilizadas para detecção de linfonodomegalia nos casos de câncer anal e retal (ENGIN, 2006). Ressalta-se também que os linfonodos sacrais estão inseridos na pelve e a sua análise ultrassonográfica fica prejudicada, justificando desta forma, o uso da tomografia computadorizada para melhor avaliação (ANDERSON et al., 2013).

Palladino et al. (2016) referem que a ultrassonografia abdominal é útil para avaliar linfonodomegalia intrapélvica, porém nem sempre é possível localizar todos os linfonodos acometidos, sendo necessário o emprego da tomografia computadorizada como exame complementar para uma correta análise de toda a cadeia de linfonodos.

Majeski et al. (2017) relataram o emprego de contraste peritumoral e tomografia computadorizada para a localização dos linfonodos sentinelas em adenocarcinomas apócrinos do saco anal, concluindo que os linfonodos que drenam a região são: os sacrais, ilíacos internos e ilíacos mediais, sendo 66% deles localizados ipsilateral à glândula acometida e os demais localizados contralateral.

E Anderson et al. (2013) compararam a ressonância magnética com a ultrassonografia abdominal na capacidade de detecção de alterações metastáticas em linfonodos, os autores relataram que a ultrassonografia abdominal teve uma falha de 67% na detecção de alterações

em linfonodos quando comparados a RM. E concluíram também que os linfonodos sacrais foram os mais acometidos.

Os exames de tomografia ou ressonância também são importantes para o planejamento cirúrgico de neoplasias extensas e invasivas, pois através da imagem é possível determinar diferentes aspectos tumorais, tais como: comprometimento ósseo, continuidade com os ossos da pelve, clivagem ou não com glúteo, cauda, reto, ânus, musculatura intrapélvica, uretra e mensurar a vascularização tumoral (ANDERSON et al., 2013; LORIGADOS et al., 2013).

2.4.3.1 Termografia

O exame termográfico tem sido realizado como método complementar de diagnóstico em neoplasias, devido, ao princípio de que em tecidos neoplásicos e adjacentes ocorre aumento do fluxo sanguíneo na área tumoral, assim como, aumento da angiogênese e da taxa metabólica, levando a um aumento de temperatura desses tecidos quando comparados aos normais (NOWAKOWSKI, 2006). A inflamação crônica presente em diferentes tumores sólidos pode também ser responsável pela alteração de temperatura nas neoplasias (XIE et al., 2004).

O aumento de temperatura em áreas adjacentes ao tumor pode ocorrer mesmo que a formação tumoral em si se mostre mais fria que a pele saudável, o mecanismo pelo qual essa alteração ocorre não é completamente compreendido, mas acredita-se que seja devido à neoangiogênese periférica (XIE et al., 2004). No entanto, em seu estudo Konerding, Steinberg (1988) não observaram aumento de temperatura nos tumores humanos transplantados em camundongos *nudes*, todas as formações se mostraram mais frias ou com mesma temperatura que a pele sadia. A causa para essa alteração de temperatura não é totalmente elucidada, porém é possível que apesar da angiogênese elevada, os novos vasos sanguíneos formados podem não ser tão eficientes, fazendo com que haja um fluxo sanguíneo tumoral reduzido quando comparado aos tecidos normais (FOX et al., 1996).

As máquinas termográficas mensuram a radiação infravermelha emanada pela pele do paciente. Há uma relação precisa entre a temperatura da superfície da pele e da radiação emitida e captada pelo aparelho em condições ambientais adequadas. A partir desta radiação são produzidas imagens características da temperatura do paciente (WEERD et al., 2011). Os

aparelhos atuais permitem a detecção de variações menores 0,1°C por milímetro quadrado de tecido (BRIOSCHI et al., 2003).

Sua utilização tem sido descrita em medicina para diagnóstico complementar, prognóstico e acompanhamento em diversos processos neoplásicos, por ser um método não invasivo, seguro e rápido de diagnóstico (POLJAK-BLAZI et al., 2009), foi aprovada pelo FDA (EUA) na década de 1980 como diagnóstico adjuvante a outras técnicas de imagem (GONZALES-HERNANDEZ et al., 2019). Existem diferentes estudos relacionados ao câncer de mama em mulheres, isso porque nessas formações se observa aumento de até 3°C na temperatura superficial nas áreas adjacentes ao tumor e também é possível fazer um diagnóstico precoce da afecção, bem como, seu prognóstico (GAUTHERIE et al., 1980; BRIOSCHI et al., 2003; SONG et al., 2007; WISHART et al., 2010; ARAÚJO et al., 2014; KANDLIKAR, et al., 2017).

No entanto, a termografia possui limitações que a impedem de ser usada como ferramenta de diagnóstico isolada em medicina, as principais dificuldades são os falsos positivos, a sensibilidade intermediária e ainda a falta de dados mais abrangentes referentes às neoplasias, como profundidade por exemplo, porém com uso de *softwares* mais avançados, de estudos matemáticos de probabilidade e melhora na qualidade das imagens vem ocorrendo um aumento gradual na confiabilidade do exame (AMRI et al., 2016; GONZALES-HERNANDEZ et al., 2019).

Apesar da maioria dos estudos atuais apontarem para o uso da termografia em tumores mamários, a utilização em outras neoplasias também é citada, como em melanomas, tumores de tireoide e paratireoide (BRIOSCHI et al., 2003).

A termografia é utilizada em diversas áreas médicas além da oncologia, como por exemplo, na medicina do esporte, ortopedia, neurologia, anestesiologia e tratamento da dor, angiologia, e cirurgia plástica e reconstrutora tanto em humanos como em animais (MARINO, 2007; LOUGHIN, 2010; KIM, PARK, 2012; GARCIA et al., 2017; KULS et al., 2017; MELO, 2017; TRONCOSO et al., 2018).

Na oncologia veterinária, vem sendo cada vez mais utilizada. Pavelski et al. (2015) demonstraram, assim como, observado em mulheres, os tumores mamários caninos são significativamente mais quentes que as glândulas mamárias não tumorais, independente do tamanho e localização do tumor. Melo et al. (2015) analisaram seu uso em mastocitomas cutâneos caninos e concluíram que a termografia é um método de diagnóstico auxiliar promissor, porém, deve ser analisada em conjunto aos demais fatores.

Até o presente momento, os autores não encontraram estudos termográficos em tumores perianais e em tumores apócrinos de saco caninos.

2.4.4 Exame Histopatológico Tumoral e Testicular

O exame histopatológico é necessário para a distinção entre adenomas e adenocarcinomas circum-anaís, para avaliação das margens cirúrgicas, acometimento de linfonodos e também a classificação histológica dos tumores testiculares quando presentes.

Os adenomas de glândula circum-anaís geralmente se apresentam no exame histopatológico como proliferação de células hepatóides, dispostas em ilhas e entremeadas a estroma colagenoso. As células neoplásicas possuem citoplasma distinto e eosinofílico, núcleo redondo, excêntrico e basofílico, cromatina rendilhada, nucléolo único e central proeminente. Geralmente, há discreta anisocitose, discreta anisocariose e discreto pleomorfismo (GROSS et al., 2005).

Os adenocarcinomas de glândula circum-anal podem apresentar proliferação neoplásica nodular a multilobulada, bem delimitados, de bordos discretamente irregulares, não encapsulados, compostos predominantemente por células hepatóides, mas pode haver em menor quantidade, células basalóides de reserva. As células hepatóides se apresentam como poligonais, de citoplasma moderado a abundante, eosinofílico, com bordos indistintos; o núcleo, geralmente é grande, ovalado, de cromatina frouxa, por vezes com um nucléolo evidente (GROSS et al., 2005). O pleomorfismo pode ser moderado a intenso, com frequente desarranjo e sobreposição celular; o índice mitótico pode ser baixo, médio ou alto com presença de figuras de mitose em células intermediárias e maduras. Podem existir focos de hemorragia e necrose intralesionais (TUREK, WITHROW, 2013).

Na histopatologia dos adenocarcinomas apócrinos do saco anal pode-se encontrar arranjos lobulares circundados por cápsula de tecido conjuntivo, contendo células com citoplasma eosinofílico e núcleos ovais a redondos, excêntricos, com cromatina finamente agregada e predominando nucléolo único evidente. As células, geralmente, se apresentam como estruturas tubulares ou semelhantes a rosetas, apresentando em seu interior material eosinofílico amorfo (GROSS et al., 2005).

Ainda segundo Berrocal et al. (1989), os tumores perianais possuem subclassificações que variam de acordo com as características histopatológicas, como graus de pleomorfismo e índices de proliferação celular. Estão divididos em adenomas e carcinomas: bem diferenciados, moderadamente diferenciados, pouco diferenciados. O baixo grau de diferenciação está relacionado com maiores recidivas, além disso, nos tumores malignos, ao desenvolvimento de metástases.

Em geral, o exame histopatológico é suficiente para a diferenciação dos processos benignos e malignos. Os adenomas usualmente mantêm uma arquitetura lobular, mas alguns podem apresentar áreas focais de pleomorfismo celular. Estas alterações podem sugerir malignidade e levar interpretações diferentes (GANGULY, WOLFE, 2006).

Os tumores testiculares estão entre as neoplasias mais comuns que acometem os cães, e são divididos em dois tipos: neoplasias de células do cordão sexual/estroma gonadal e tumores germinativos. Sendo os leydigomas e sertolinomas classificados como neoplasias de células do cordão sexual e os seminomas como germinativos (AGNEW, et al., 2017). Os leydigomas são considerados os mais comuns em cães (CREASY, et al., 2012). As neoplasias testiculares são pouco invasivas e raramente observa-se a formação de metástases (MACLACHLAN, KENNEDY, 2002).

As células de Leydig produzem hormônios androgênicos, estes por sua vez, são necessários para a realização da espermatogênese, para aquisição das características de maturidade sexual e manutenção das glândulas acessórias (BOOTHE, 2003). Como os tumores perianais possuem receptores para hormônios androgênicos, uma expressão elevada desses hormônios por um Leydigoma, acaba contribuindo para o crescimento e desenvolvimento tumoral, principalmente nos adenomas, já que estes possuem mais receptores androgênicos que os adenocarcinomas (WILSON, HAYES, 1979; PISANI et al., 2006; AGNEW, et al., 2017).

Os sertolinomas derivam das células de Sertoli, localizadas nos túbulos seminíferos, são neoplasias de crescimento lento e de caráter não invasivo, porém podem ocasionar a síndrome do hiperestrogenismo. Os seminomas se originam a partir de células espermatogênicas presentes nos túbulos seminíferos, geralmente são benignos, porém de 5 a 10% podem apresentar grau de malignidade. Assim como os sertolinomas, os seminomas também podem aumentar os níveis séricos hormonais (NØDTVEDT et al., 2011; HORNAKOVA et al., 2017).

2.4.5 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica vem sendo utilizada como método de diagnóstico e prognóstico para diversos tumores na oncologia. Estudos variados estão em andamento para identificação de novos marcadores moleculares que possibilitem diagnósticos e prognósticos mais precisos, para que seja escolhido o tratamento mais adequado por meio de uma avaliação individual (MORRIS, DOBSON, 2001). Nos tumores perianais alguns marcadores imuno-histoquímicos já foram descritos para diferentes funções, principalmente para diagnóstico em tumores com morfologia semelhante, definindo critérios de benignidade e malignidade, e também para prognóstico (WASQUES, 2018), bem como para tumores apócrinos de saco anal (SUZUKI et al., 2013).

Alguns hormônios, como o estrógeno podem induzir a síntese de VEGF (*Vascular endothelial growth fator* – fator de crescimento endotelial vascular) no tecido tumoral, estimulando a angiogênese e a proliferação celular e consequente crescimento tumoral e aumento da taxa de recidivas após excisão cirúrgica (JAROSZ, WOZNIAK, 2012), como os tumores perianais possuem receptores androgênicos e também estrogênicos (ELLING, et al., 1980; PISANI et al., 2006), é possível que haja uma maior expressão de VEGF nessas formações. Em um estudo relacionando o hormônio β -estradiol com os níveis de VEGF sanguíneo Sobczyńska-rak; Brodzki, (2014) demonstraram correlação positiva nos epitelomas circum-anais, mas não nos adenomas circum-anais. Estudos correlacionando a expressão de VEGF com prognóstico, como existe em mastocitomas (MELO 2013, MELO, 2017), não foram encontrados até momento.

O antígeno Ki-67 possui papel fundamental na proliferação celular, sendo expresso nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, mas não na fase G0, dessa forma, o Ki-67 distingue células em proliferação de células quiescentes. A expressão Ki-67 é geralmente estimada em porcentagem de células imunocoradas com uma coloração nuclear, sendo este o critério mais comum para o índice proliferativo (GERDES et al., 1991). Em seus estudos, Pereira et al. (2013) e Brodzki et al. (2014a) demonstraram que os carcinomas de glândulas circum-anais possuem porcentagem significativamente maior de células imunocoradas do que os adenomas e células normais, mas não houve diferença significativa de porcentagem entre adenomas e células normais. Além disso, dentre os carcinomas analisados, os que possuíram o índice proliferativo maior, tiveram uma maior porcentagem de recorrência.

A molécula de adesão celular endotelial plaquetária 1 (CD-31) é uma glicoproteína transmembrana expressa por células endoteliais e por diferentes células hematolinfóides (DELISSER, NEWMAN, ALBELDA, 1993). É considerado um marcador bastante específico para células e tumores epiteliais, porém possui diferentes funções em várias vias metabólicas, fisiológicas e tumorais, atuando principalmente em ativação plaquetária, angiogênese, manutenção da integridade vascular, imunomodulação (CHENG et al., 2015; THAUNAT, 2015; LERTKIATMONGKOL et al., 2016). A expressão de CD-31 ainda não é bem estabelecida em cães, porém em humanos pode estar relacionada a menor sobrevida e menor tempo livre de doença (CHARPIN et al., 1997). Ramos-Vara, Miller, Dusold (2018) avaliaram vários tumores caninos e dentre eles quatro eram adenocarcinomas apócrinos de saco anal, eles constatam alta expressão de CD-31 em um adenocarcinoma apócrino de saco anal avaliado. Estudos em tumores perianais não foram encontrados até o momento.

2.5 ESTADIAMENTO CLÍNICO

O estadiamento clínico dos tumores cutâneos caninos tem sido realizado conforme preconização da *World Health Organization (WHO)* (OWEN et al., 1980), tendo por objetivo classificá-los de acordo com tamanho e grau de acometimento de outras estruturas. Auxilia dessa forma no diagnóstico, tratamento e prognóstico dessas neoplasias, os critérios do estadiamento estão expostos no quadro 1. Para adenocarcinomas apócrinos de saco anal, Polton; Brearley (2007) propuseram a aplicação de estágios clínicos para melhor classificação, decisão de tratamento e prognóstico, visto que os esses tumores apresentam grande variabilidade em relação à progressão da doença e presença de metástase no momento do diagnóstico (ROSS et al., 1991; WILLIAMS et al., 2003; TUREK, WITHROW, 2013; POTANAS; PADGETT; GAMBLIN, 2015), identificação dos estágios encontra-se no quadro 2.

Quadro 1 – Estadiamento clínico dos tumores cutâneos caninos segundo a WHO.

T: tumor primário
T0: sem evidência tumoral
T1: tumor < 2cm, superficial, não aderido
T2: tumor 2 a 5cm, ou pouco aderido independente do tamanho
T3: tumor >5cm, ou com invasão de subcutâneo independente do tamanho
T4: tumor invadindo outras estruturas como fáscia, músculo, osso ou cartilagem
N: linfonodo regional
N0: sem evidências de metástase
N1: linfonodos ipsilaterais móveis
N1a: linfonodos de tamanho normal
N1b: linfonodos aumentados
N2: linfonodos contralaterais ou bilaterais móveis
N2a: linfonodos de tamanho normal
N2b: linfonodos aumentados
N3: linfonodos fixos
Nx: não é possível determinar
M: metástase à distância
M0: sem evidências de metástase à distância
M1: presença de metástases à distância
Mx: não é possível determinar

Fonte: Owen (1980)

Quadro 2 – Estadiamento clínico para os adenocarcinomas apócrinos de saco anal.

Estágio clínico	T	N	M
Estágio 1	< 2,5 cm diâmetro	Ausente	Ausente
Estágio 2	> 2,5 cm diâmetro	Ausente	Ausente
Estágio 3a	Qualquer T	Presente < 4,5cm diâmetro	Ausente
Estágio 3b	Qualquer T	Presente > 4,5cm diâmetro	Ausente
Estágio 4	Qualquer T	Qualquer N	Presente

T: tumor primário, N: alterações em linfonodos regionais, M: metástase à distância

Adaptado de Poltron; Brearley (2007)

ZANUTO, E. B. M.

2.6 TRATAMENTO

2.6.1 Modalidades terapêuticas

Diferentes terapias para o tratamento de tumores perianais e apócrinos do saco anal são descritos em literatura. Desde o uso de moduladores hormonais como o Tamoxifeno até quimioterapia antineoplásica. Cada neoplasia tem uma conduta terapêutica diferente que serão apresentadas a seguir.

A orquiectomia nos machos e a excisão cirúrgica do tumor são consideradas curativas na grande maioria dos adenomas resultando em baixa taxa de recidiva, sem necessidade de margens amplas (WILSON, HAYES, 1979; DOW et al., 1988). Em adenomas difusos, grandes ou que acometem grande porção do esfíncter anal, há a indicação da orquiectomia com remoção da massa tumoral após até 180 dias, isto porque o volume tumoral se reduz após a interrupção do estímulo hormonal (WILSON, HAYES, 1979). Brodzki et al. (2014b) referiram o uso de dois moduladores hormonais, Tamoxifeno (anti-estrogênico) e Androcur (anti-testosterona), a escolha do fármaco foi realizada após biópsia dos tumores, aonde foi avaliada a concentração de β - estradiol e testosterona. Para os adenomas circum-anais observou-se remissão completa em 90% dos casos e ausência de recidiva em 6 meses, com a administração durante um mês do fármaco. Porém o mesmo resultado não foi alcançado em epiteliomas e adenocarcinomas circum-anais.

Outras terapias também podem ser utilizadas no tratamento dos adenomas perianais, como a criocirurgia, a radioterapia e a eletroquimioterapia (GILLETTE, et al., 1970; TOZON, et al., 2005; SPUGININI, et al., 2007).

Os adenocarcinomas não respondem à orquiectomia como tratamento único, sendo indicada a excisão cirúrgica com margens amplas. Linfonodos regionais podem ser excisados quando necessário, principalmente quando eles obstruem o canal pélvico ou contribuem para hipercalcemia. A recorrência local do tumor é comum, por isso, pode ser necessária a realização de outras cirurgias paliativas ao longo do tratamento. O diagnóstico pré-cirúrgico de neoplasia maligna com citologia ou biópsia incisional e tomografia permite um melhor planejamento da cirurgia e maiores taxas de sucesso (TUREK, WITHROW, 2013).

Algumas complicações pós-cirúrgicas podem ocorrer devido ao volume tumoral, grau de comprometimento de estruturas adjacentes e localização da ferida cirúrgica. Dentre elas, pode-se citar: infecções locais, deiscência da ferida cirúrgica, incontinência fecal temporária ou permanente e estenose anal. A cirurgia com margens amplas nem sempre é possível, pois ao mesmo tempo em que se deseja margens cirúrgicas livres de células neoplásicas é necessário tentar conservar ao máximo a integridade do esfíncter anal externo, evitando desta forma uma possível incontinência fecal permanente. Em casos extremos, devido ao estadiamento avançado da doença não é possível e a remoção do esfíncter se faz necessária (FOSSUM, 2015).

Tentando manter a integridade do esfíncter, porém ao mesmo tempo visando a remoção total da neoplasia, alguns autores sugerem tratamentos alternativos como a eletroquimioterapia (TOZON et al., 2005; SPUGNINI et al., 2007) obtendo taxas de remissão completas variando entre 41 a 88% dos casos, porém funcionando melhor em tumores menores que 1cm. Estudos antigos com radioterapia demonstram resposta completa sem recidiva em torno de 55% dos casos, porém devido a efeitos adversos em curto e longo prazo, como por exemplo, colite crônica em diversos pacientes, a radioterapia pode não ser uma terapia de escolha para esses tumores (MORGAN, CARLSON, 1963; GILLETTE, 1970; ANDERSON et al., 2002).

Assim como nos tumores ACGCA, alguns autores indicam a eletroquimioterapia, porém neste caso adjuvante à cirurgia nos pacientes ACASA com tempo livre de doença de 18 meses (SPUGNINI et al., 2008), outros autores referem o uso de radioterapia associada à quimioterapia obtendo bons resultados, com sobrevidas variando de 906 a 1420 dias mesmo em caso de metástase abdominal, porém apresentando os mesmos problemas relacionados aos efeitos adversos descritos anteriormente (TUREK et al., 2003). Meier et al. (2019) destacam a necessidade de padronização da dose para a irradiação intra-abdominal com o intuito de diminuir efeitos adversos.

O tratamento adjuvante com quimioterapia, radioterapia ou eletroquimioterapia podem ser utilizados para controle da doença e das metástases (GILLETTE, et al., 1970; TOZON, et al., 2005; SPUGNINI, et al., 2007).

Não existe até o momento uma terapia de escolha para a diminuição das recidivas e controle de metástases dos adenocarcinomas de glândula circum-anal, e nem para os adenocarcinomas apócrinos de saco anal, portanto, mais estudos clínicos são necessários para essas afecções.

A quimioterapia adjuvante pode ser considerada, devido, à alta taxa de metástases dos adenocarcinomas apócrinos de saco anal. E pode ser utilizada nos adenocarcinomas de glândula

circum-anal para diminuir a taxa de recidivas e de metástase regionais ou à distância. A quimioterapia convencional combinada com cirurgia ou radioterapia é mais utilizada atualmente, porém com o surgimento da quimioterapia metronômica novos estudos estão em andamento.

2.6.2 Quimioterapia

2.6.2.1 Quimioterapia convencional (Máxima dose tolerada)

A quimioterapia convencional consiste na administração de altas doses de quimioterápico com o objetivo de eliminar o maior número de células neoplásicas por aplicação, ela também é conhecida como quimioterapia baseada na maior dose tolerada, ou seja, é utilizada uma dose que não cause danos irreversíveis ao organismo, no menor intervalo de tempo possível (TUREK, WITHROW, 2013).

A principal problemática dessa terapia é falta de especificidade dos quimioterápicos em relação às células tumorais, ocorrendo destruição concomitante de células normais que possuem alta velocidade de duplicação, como por exemplo, os granulócitos e as células do trato gastrointestinal. Justificando desta forma, o aparecimento dos efeitos colaterais mais comuns da quimioterapia tradicional, como a neutropenia, êmese e diarreia. Outra adversidade da quimioterapia tradicional é o mecanismo de resistência aos quimioterápicos desenvolvido pelas células tumorais. A resistência pode ser primária, ou seja, quando a célula tumoral já possui um bloqueio adquirido ao quimioterápico, ou secundária, quando ela adquire após o contato com o fármaco (GUSTAFSON et al., 2013; CHU, 2013).

Os estudos referentes ao tratamento quimioterápico para adenocarcinomas circum-anaís são escassos e mais antigos, a ênfase de tratamento consiste em terapia locais para controle de recidivas. Ogilvie et al. (1989) e Hammer et al. (1994) referem o uso de doxorubicina e actinomicina D, respectivamente, ambos com resposta parcial.

Os quimioterápicos geralmente utilizados para adenocarcinomas apócrinos de saco anal são: carboplatina, cisplatina, actinomicina D, mitoxantrona e melfalano (VAIL et al., 1990; HAMMER et al., 1994; BENNETT et al., 2002; TUREK et al., 2003; EMMS et al., 2005;

POLTON, BEARLEY, 2007; POTANAS; PADGETT; GAMBLIN; 2015; WOUDA et al., 2016). Bennett *et al.* (2002) referem o uso de piroxicam como tratamento paliativo em adenocarcinomas apócrinos de saco anal. Cisplatina e bleomicina têm seu uso associado à técnica de eletroquimioterapia (TOZON, et al., 2005; SPUGININI, et al., 2007).

Turek et al. (2003) referem o tratamento adjuvante à cirurgia de 15 cães portadores de adenocarcinoma do saco anal com radioterapia associada a quimioterapia convencional com mitoxantrona numa dose de 5mg/m², no total de 5 aplicações a cada 21 dias. No momento do diagnóstico, quatro cães estavam hipercalcêmicos e sete cães apresentavam metástase em linfonodo regional. Todos os cães com metástases em linfonodos regionais receberam irradiação pélvica. A sobrevida livre de doença foi em média 287 dias, e a sobrevida global foi em média 956 dias.

Em outro estudo Emms et al. (2005) realizou quimioterapia convencional com melfalano após a ressecção cirúrgica do tumor em cães portadores de adenocarcinoma apócrino de saco anal, e nos pacientes com metástase em linfonodos sublobares foi realizada a linfadenectomia. O tempo médio de sobrevida dos cães com metástase regional foi de 20 meses e para os cães com tumor não metastático foi de 29,3 meses.

Trabalhos recentes têm associado quimioterapia convencional com metronômica visando o aumento da eficácia de ambos os tratamentos, Woulda; Hocker; Higginbotham (2018) utilizaram carboplatina somado a toceranib em neoplasias caninas de diferentes origens e observaram que o tratamento foi bem tolerado e com benefícios clínicos na parte dos pacientes. No entanto, Alexander et al. (2019) não observaram diferença significativa na adição de quimioterapia metronômica no protocolo tradicional para cães com hemangiossarcoma esplênico.

2.6.2.2 Quimioterapia metronômica

A quimioterapia metronômica é uma modalidade terapêutica que consiste no uso de quimioterápicos em doses mais baixas que as convencionais, em intervalos menores e ininterruptos (HANAHAN, 2000; KERBEL, KAMEN, 2004; MAITI, 2014). Há indícios que a quimioterapia em intervalos mais curtos propicie uma probabilidade menor de resistência aos

quimioterápicos, pois inibe o crescimento de novas células tumorais continuamente (HANAHAHAN, 2000).

As vantagens desse tratamento incluem: diminuição dos efeitos colaterais quando comparado com a quimioterapia dose máxima tolerada, baixo custo, praticidade de administração, reduzido potencial de desenvolvimento de resistência aos fármacos, efeito antiangiogênico e imunestimulatório (HANAHAHAN, 2000).

A quimioterapia metronômica tem capacidade de inibir o processo de angiogênese tumoral. O mecanismo de angiogênese consiste no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, a partir de vasos pré existentes. Nas células tumorais e nas células não neoplásicas a angiogênese é induzida principalmente pela hipóxia tecidual (LOPES; CHAMMAS; YEYASU, 2013).

A hipóxia presente no microambiente tumoral e a mutação da oncoproteína Ras estimulam a expressão constitutiva do fator induzido por hipóxia (HIF-1) nas células tumorais, este por sua vez estimula o processo de angiogênese pela indução de VEGF, fator de crescimento de fibroblastos, e fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), sendo o VEGF o mais importante por estimular o recrutamento de células endoteliais progenitoras na medula óssea. Essas células possuem capacidade de replicação maior que células comuns (FRAISL et al., 2009). Contudo, os vasos sanguíneos neoformados apresentam irregularidades em sua conformação e muitas vezes não funcionam corretamente, persistindo assim, a hipóxia tumoral e a perpetuação da angiogênese (ZHENG, 2012).

Na circulação sanguínea estão presentes também fatores anti-angiogênicos, sendo o mais importante deles a trombospondina-1 (TSP-1) que inibe a liberação de VEGF e se liga a esse fator para iniciar a degradação do mesmo, e estimula a apoptose das células endoteliais dos vasos (BERGERS et al., 2003).

Estudos demonstram que a quimioterapia metronômica tem a capacidade de inibir as células endoteliais progenitoras, além de induzir a apoptose das células endoteliais dos vasos neoformados e aumentar a concentração sérica de trombospodina 1. Além de poder tornar a neoplasia quiescente, provocando a morte das células tronco neoplásicas (FOLKINS et al., 2007).

O caráter imuno-estimulatório da quimioterapia metronômica decorre da ativação de linfócitos T citotóxicos e células *NK* – *natural killers* (FOLKINS et al., 2007; PADURA-MARTIN et al., 2012).

A quimioterapia metronômica tem se mostrado bem tolerável em relação aos efeitos adversos, sendo estes mais amenos quando comparados aos da quimioterapia tradicional (LIEN et al., 2013). Na medicina veterinária, diferentes trabalhos confirmam a baixa toxicidade, principalmente em cães, sendo a maioria dos efeitos adversos classificados como grau 1 e 2. Segundo, VCOG-CTCAE - *Veterinary cooperative oncology group – common terminology criteria for adverse events v 1.*, a toxicidade quimioterápica é classificada como 1 - leve, 2 - moderada, 3 - grave, 4 - risco de óbito, 5 - óbito. (Somente para cão) (Quadro 3) (VCOG, 2011; BILLER, 2014).

Quadro 3- Terminologia para classificação dos efeitos adversos segundo VCOG-CTCAE.

Efeito adverso	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Anemia	Cão Ht 30% a < LI	Ht 20 a < ht 30%	Ht < 20 a ht > 15%	Ht <15%
Neutropenia	1500/ μ L a < LI	1000 - 1499/ μ L	500 - 999/ μ L	< 500/ μ L
Trombocitopenia	100 x10 ³ /uL a < LI	50 a 99 x10 ³ /uL	25 a 49 x10 ³ /uL	< 25 x10 ³ /uL
Anorexia	Alteração da dieta para que continue a se alimentar	Diminuição da ingestão de alimento (< 3 dias) sem perda de peso, indicado o uso de estimulantes de apetite	Diminuição da ingestão de alimento (> 3 dias) com perda de peso (> 10%) com necessidade de nutrição enteral.	Consequências potencialmente fatais, indicado o uso de nutrição parenteral
Êmese	< 3 episódios, não indicado tratamento médico	3-10 episódios em 24 horas, < 5 episódios por dia em < 48 horas, indicado tratamento suporte	Múltiplos episódios em > 48 h indicada a hospitalização	Consequências potencialmente fatais (colapso circulatório)
Diarreia	Mais que 2 episódios e diminuição da consistência	De 3 a 6 episódios, indicado uso de tratamento suporte	Mais que 6 episódios, indicada a hospitalização	Consequências potencialmente fatais (colapso circulatório)

Cistite	Assintomática, hematúria microscópica, não é necessário descontinuar o tratamento	Polaciúria com disúria, hematúria macroscópica, esporádica, descontinuar o tratamento	Indicada a transfusão de sangue e uso de analgésicos e é necessário descontinuar o tratamento	Intenso sangramento, pode até ser indicado procedimento cirúrgico
Letargia	Letargia leve, mas capaz de interagir	Letargia moderada, animal deambula para se alimentar	Dificuldade de deambulação	Incapacidade de deambulação
Toxicidade hepática	Aumento de 1,5x dos valores de referência ALT	Aumento de 1,5 a 4x dos valores de referência ALT	Aumento de 4 a 10x dos valores de referência ALT	Aumento > 10x dos valores de referência ALT
Toxicidade renal	Aumento de 1,5x dos valores de referência de creatinina	Aumento de 1,5 a 2x dos valores de referência de creatinina	Aumento de 2 a 3x dos valores de referência de creatinina	Aumento >3x dos valores de referência de creatinina
ht: hematócrito; LI- limite inferior do valor de referência: 37%; valores de referência ALT: 10 – 88; valores de referência de creatinina: 0,7 – 1,4; valores de referência plaquetas: 200 a 500 x10 ³ /uL				

Fonte: VCOG, 2011

Alguns estudos na medicina veterinária foram realizados a partir dos anos 2000, em sua maioria utilizando diversos tumores em um mesmo estudo e um número reduzido de animais (LANA et al., 2007; ELMSLIE et al., 2008; BURTON et al., 2011; MARCHETTI et al., 2012; BILLER, 2014; CUSTEAD et al., 2016). Em uma revisão de literatura realizada por Gaspar et al. (2018), observaram que poucos estudos clínicos detalhados e padronizados foram realizados para validar a quimioterapia metronômica de forma confiável; porém concluem que mais estudos clínicos seriam necessários para validar.

Os fármacos mais utilizados são a ciclofosfamida, a lomustina e o clorambucil (TRIPP et al., 2011; SCHREMPF et al., 2013). O uso de inibidores de ciclooxigenase 2 (COX-2) também é citado como terapia adjuvante ao tratamento da quimioterapia metronômica (ELMSLIE et al., 2008), assim como, o uso de os inibidores de receptores tirosina quinase que atuam inibindo a ligação do VEGF e do PDGF (ARORA et al., 2005; HAFNER et al., 2005). Barnes, Demetriou (2017) referem a associação do melfalano em dose metronômica com o piroxicam ou meloxicam, e a associação da ciclofosfamida em dose metronômica com prednisona.

A ciclofosfamida é uma mostarda nitrogenada, qualificada como agente alquilante que atua na inibição da síntese e da divisão do DNA. É um quimioterápico citostático, ciclo celular não específico, utilizado amplamente na medicina veterinária em diversos protocolos como linfomas, leucemias, hemangiossarcomas, sarcomas de tecidos moles, sarcoma de células sinoviais, tumores orais, neoplasias mamárias, carcinomas de tireóide e TVT (tumor venéreo transmissível) (RODASKI, 2008).

É metabolizada no fígado, por meio da enzima fosfamidase e é excretada pelos rins. Pacientes com alterações em esses órgãos devem ser monitorados, e em casos específicos as doses do quimioterápico devem ser reduzidas ou o tratamento suspenso. Outros efeitos adversos também podem ocorrer no decorrer da terapia, como efeitos hematológicos, principalmente a leucopenia; efeitos gastrintestinais, como êmese, diarreia e anorexia; efeitos urológicos, em que ocorre a cistite hemorrágica estéril ocasionada pela irritação da mucosa vesical pela acroleína, um metabólito da ciclofosfamida (CHAN et al., 2016; MATSUYAMA et al., 2017). Outro efeito urinário citado, porém raro, foi o desenvolvimento de tumores de bexiga após tratamentos prolongados; efeitos dermatológicos, em que os pacientes podem desenvolver hiperpigmentação e alopecia; e efeitos teratogênicos e mutagênicos em experimentos *in vitro* (RODASKI, DE NARDI, 2008).

Inibidores de tirosina quinase (toceranib) têm sido utilizados em adenocarcinomas apócrinos do saco anal para controle da doença e metástases, e estão associados a um curto período de remissão, em torno de 19 a 25 semanas (LONDON et al., 2011). Mitchell, Thamm, Biller (2012) não observaram aumento da toxicidade na combinação de ciclofosfamida com toceranib. Elliott (2019) utilizou em cães com adenocarcinoma apócrino avançado (estágio 4) e Heaton (2020) observou em 69% dos cães benefício no tratamento.

Clorambucil e lomustina foram utilizados em dose metronômica em alguns estudos em cães. O clorambucil foi utilizado em carcinomas de células de transição, na dose de 4mg/m², uma vez ao dia. Neste estudo, os autores observaram que 70% dos pacientes apresentaram doença estável ou remissão parcial da doença (SCHREMPP et al., 2013).

A dose de ciclofosfamida utilizada em quimioterapia metronômica varia de acordo com diferentes protocolos descritos em literatura. Essa dose varia geralmente entre 12,5 a 25mg/m². Burton et al. (2011) compararam duas dose de ciclofosfamida na dose metronômica (12,5 e 15mg/m²) no tratamento de sarcomas de tecidos moles, e concluíram que a dose de 15mg/m² reduziu a porcentagem de linfócitos T reguladores e a densidade dos microvasos tumorais, enquanto que a dose de 12mg/m² não teve o mesmo efeito.

Estudos comparando a eficácia da quimioterapia metronômica com a convencional demonstram similaridade de tempo de sobrevida dos cães tratados (MATSUYAMA et al., 2020; TREGGIARI et al., 2020). No entanto, Marconato et al. (2020), observaram que hemangiossarcomas esplênicos grau III, a quimioterapia convencional teve maior sobrevida, porém maiores efeitos colaterais.

O uso da quimioterapia metronômica em tumores perianais caninos não foram encontrados e o uso em adenocarcinomas apócrinos de saco anal ainda é limitado, (TRIPP et al., 2011; MARCHETTI et al., 2012). Em seu estudo, Tripp et al. (2011) utilizaram a quimioterapia metronômica com lomustina em diferentes tumores caninos, sendo eles, hemangiossarcoma, melanoma oral, carcinoma de tireoide, sarcoma anaplásico, fibrossarcoma, mastocitoma, mieloma múltiplo, quimiodectoma, carcinoma nasal, carcinoma basocelular, osteossarcoma e condrossarcoma. De todas estas neoplasias tratadas apenas um paciente apresentava adenocarcinoma apócrino do saco anal. A dose utilizada foi de 2,84 mg/m² durante 4 meses.

Marchetti et al. (2012) descreveram um estudo com 15 animais portadores de diferentes tumores, sendo um dos tumores adenocarcinoma apócrino do saco anal. Os pacientes foram tratados com ciclofosfamida (25mg/m² por via oral uma vez ao dia) associado ao celecoxibe (2,0 mg/kg por via oral uma vez ao dia). Os autores não especificam a sobrevida de cada animal separadamente, mas sim, fazem uma análise global dos casos, sendo que, um cão apresentou remissão completa, cinco apresentaram doença estável e a mediana do tempo de sobrevida foi de aproximadamente 99 dias. Os autores observaram também diminuição da concentração sérica de VEGF nos cães que responderam bem ao tratamento quimioterápico. Não foram observados efeitos colaterais nos animais tratados. Esse estudo sugere que o VEGF pode ser um marcador de resposta ao tratamento e que esse protocolo pode ser uma alternativa de tratamento aos animais que já apresentam metástases no momento do diagnóstico.

2.7 PROGNÓSTICO

Os adenomas apresentam prognóstico bom, com cerca de 90% de cura após a orquiectomia e excisão cirúrgica. Já os adenocarcinomas possuem prognóstico reservado a mal. O prognóstico depende do estadiamento do tumor e do tratamento. A hipercalcemia presente,

principalmente, nos adenocarcinomas de saco anal é um fator prognóstico negativo (WILLIANS et al., 2003; PEREIRA et al., 2013; TUREK, WITHROW, 2013).

São considerados fatores prognósticos negativos: grande volume tumoral, presença de metástases em linfonodos, presença de metástases à distância, estadiamento clínico avançado, não realização de procedimento cirúrgico, tratamento com quimioterapia sozinha, e a interrupção do tratamento (TUREK, WITHROW, 2013). Animais que apresentam metástase à distância em linfonodos, têm sobrevida menor comparando aos que não apresentam metástase no momento do diagnóstico (WILLIANS et al., 2003; LABRES-DIAZ et al., 2004; MAYER, 2010).

Pacientes com adenocarcinomas de glândula circum-anal podem ter tempo livre de doença de cerca de 2 anos, dependendo da terapia empregada e do estadiamento do paciente. Em um estudo com 41 adenocarcinomas de glândula circum-anal, o estadiamento tumoral teve significativa importância na sobrevida (VAIL et al., 1990). Terapias combinadas com cirurgia, quimioterapia e radioterapia se mostraram favoráveis quando comparadas a terapias isoladas (POLTRON, BREARLEY, 2007). Tumores maiores, com metástase em linfonodos ou metástases à distância, o tempo de sobrevida cai por volta de 7 meses (WITHROW et al., 1990). Nos adenocarcinomas apócrinos de saco anal o período livre de doença varia entre 6 à 18 meses, dependendo do estadiamento do paciente (BENNET, et al., 2002; WILLIANS et al., 2003).

Pacientes que apresentam altos índices proliferativos aferidos por Ki-67 e PCNA, apresentam maior índice de metástase e recorrências quando comparados a indivíduos que não possuem essas mutações (MARTINS et al., 2008; PEREIRA et al., 2013; BRODZKI et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar prospectivamente as características clínicas, cirúrgicas, termográficas, citológicas, histopatológicas, terapêuticas e imuno-histoquímicas dos tumores perianais caninos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar as características clínicas do paciente;
2. Analisar a correlação diagnóstica entre citologia e exame histopatológico dos tumores circum-anaís e dos adenocarcinomas apócrinos de saco anal caninos;
3. Capturar e analisar imagens termográficas dos tumores circum-anaís e dos adenocarcinomas apócrinos de saco anal caninos, comparando com a pele sadia e entre si;
4. Caracterizar os tumores perianais e tumores do saco anal por meio de painel imuno-histoquímico e correlacionar com a resposta à terapia e ao prognóstico;
5. Analisar prospectivamente os efeitos adversos gastrintestinais e hematológicos com o uso da quimioterapia metronômica com ciclofosfamida e piroxicam em pacientes com adenocarcinomas de glândula circum-anal e adenocarcinomas apócrinos de saco anal;
6. Avaliar o tempo de sobrevida e o tempo livre de recidiva dos pacientes submetidos à quimioterapia metronômica e comparar com os pacientes que não receberam a terapia.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto foi aprovado pela CEUA da FMVZ/USP em 17 de novembro de 2015, recebendo o número de protocolo 2486060215. A inclusão dos pacientes neste trabalho foi autorizada pelos tutores por meio do termo de consentimento livre e esclarecido.

4.1 ESTUDO CLÍNICO-CIRÚRGICO

Foram incluídos neste estudo animais atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – Departamento de Cirurgia junto ao HOVET – FMVZ/USP durante o período de agosto/2015 a dezembro/2018.

O grupo de estudo foi constituído de 80 cães de ambos os sexos e idades variadas, com ou sem raça definida. Os animais foram divididos em três grupos denominados:

Grupo **AGCA** - pacientes com adenomas de glândula circum-anal;

Grupo **ACGCA** - pacientes com adenocarcinomas de glândula circum-anal;

Grupo **ACASA** - pacientes com adenocarcinomas de glândula apócrina do saco anal.

Para realização do estudo terapêutico, os animais foram divididos em subgrupos para correta diferenciação dos respectivos protocolos de tratamento. Os subgrupos foram separados em:

Subgrupo I: cães portadores de adenomas de glândulas circum-anais, que foram submetidos à excisão cirúrgica tumoral, e orquiectomia nos machos não-castrados, e excisão cirúrgica tumoral nas fêmeas;

Subgrupo II: cães portadores de adenocarcinomas de glândulas circum-anais, que foram submetidos à excisão cirúrgica tumoral, e orquiectomia nos machos não-castrados, e excisão cirúrgica tumoral nas fêmeas, **com** quimioterapia metronômica adjuvante;

Subgrupo III: cães portadores de adenocarcinomas de glândulas circum-anais, que foram submetidos à excisão cirúrgica tumoral, e orquiectomia nos machos não-castrados, e excisão cirúrgica tumoral nas fêmeas, **sem** quimioterapia metronômica adjuvante;

Subgrupo IV: cães portadores de adenocarcinomas apócrinos do saco anal, que foram submetidos à excisão cirúrgica tumoral, e orquiectomia nos machos não-castrados, e excisão cirúrgica tumoral nas fêmeas, **com** quimioterapia metronômica adjuvante.

Critérios de inclusão: cães de ambos os sexos com formações em região perianal com diagnóstico histopatológico confirmado de tumor circum-anal; adenoma ou adenocarcinoma apócrino do saco anal.

Critérios de exclusão: cães sem condição clínica para realização do procedimento cirúrgico.

Por entender que afecções oncológicas necessitam de tratamento adequado a todos os pacientes, devido a critérios éticos, não foi previsto pelo projeto grupo controle com placebo. No entanto, o subgrupo III que atuou como controle para subgrupo II foi formado pelos animais cujos tutores não desejaram realizar o tratamento quimioterápico adjuvante. Para esses tutores foi aplicado, por contato telefônico, um questionário a respeito de recidiva tumoral e tempo de sobrevida dos animais ao término do projeto.

Os cães do subgrupo I receberam alta após o resultado do histopatológico, sendo orientados a retornar ao HOVET USP caso observassem recidiva tumoral. Os animais dos subgrupos II e IV que fizeram quimioterapia foram acompanhados até o fim do projeto ou óbito.

Os dados dos pacientes foram coletados no atendimento clínico inicial, foram considerados: sexo, idade, raça, localização, tamanho, características visuais da formação, e após os exames de imagem, em um segundo atendimento foi incluído o estadiamento clínico ao prontuário.

O estadiamento dos tumores seguiu os parâmetros da *World Health Organization (WHO)* para tumores cutâneos caninos (In: WELLE et al., 2008; TUREK, WITHROW, 2013). A classificação TNM foi baseada em exames de imagem, visto que os linfonodos usualmente acometidos por metástases dos adenocarcinomas se encontram intrapélvicos ou intra-abdominais, dificultando o acesso para realização do estadiamento por punção. Considerou-se metastáticos linfonodos aumentados de tamanho e heterogêneos.

Os cães foram submetidos à intervenção cirúrgica para a retirada das neoplasias sob os princípios da cirurgia oncológica. Nas formações maiores e mais invasivas realizaram-se técnicas de anaplastia, sempre que necessário, visando à diminuição das complicações pós-cirúrgicas.

4.2 ESTUDO LABORATORIAL – CÁLCIO IÔNICO

Em todos os animais foram coletados exames laboratoriais pré-cirúrgicos contendo hemograma completo, perfil renal com análise de ureia e creatinina, perfil hepático com a mensuração da alanina transferase (ALT), fosfatase alcalina (FA). O cálcio ionizado foi realizado em todos os animais para avaliação de possível hipercalcemia. Nos animais do grupo II e III que receberam a quimioterapia metronômica, os exames laboratoriais foram repetidos mensalmente até o término da terapia.

4.3 ESTUDO CITOLÓGICO-HISTOPATOLÓGICO

Os exames citológicos foram coletados por meio da punção aspirativa por agulha fina e pelo menos duas amostras de cada neoplasia foram analisadas. A coleta foi realizada com o paciente em estação e com a cauda flexionada para cima, em seguida, foi efetuada a antisepsia da região com álcool 70%. A formação foi fixada entre o dedo indicador e o polegar, e com uma agulha 20 mm x 5,5 foram realizados 10 movimentos de “vai e vem” em diversas direções e profundidades do tumor. Após o procedimento, a agulha foi acoplada a uma seringa de 5 ml e o conteúdo foi depositado em uma lâmina de vidro onde foi preparado o esfregaço através da técnica de esmagamento.

Após a secagem o esfregaço foi corado com Panótico rápido (Laborclin), e analisado posteriormente sempre pela mesma patologista, a M.V. Maria Luiza Franchini. O resultado da citologia foi comparado ao resultado do exame histopatológico para avaliação da eficiência do exame citológico como diagnóstico inicial das neoplasias perianais caninas.

O exame histopatológico foi realizado em todas as amostras. Imediatamente após a ressecção cirúrgica, os tumores e os testículos foram acondicionados em frascos e fixados em formalina 10%. Sete tumores seguiram para análise em laboratório particular CVAP – Centro Veterinário de Anatomia Patológica) e 72 ao Serviço de Patologia da Universidade de São Paulo.

Os materiais fixados foram incluídos em blocos de parafina, seccionados e, posteriormente, corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE). A análise histológica foi

realizada por microscopia óptica em que se avaliou a população celular, índice mitótico, conformação celular, invasão vascular, atipia celular e margens cirúrgicas.

O exame histopatológico dos testículos foi realizado para caracterizar os tumores testiculares e a sua relação com os tumores perianais.

4.4 EXAMES DE IMAGEM (ULTRASSONOGRAFIA, RADIOGRAFIA TORÁCICA E TOMOGRAFIA)

Todos os pacientes foram submetidos à ultrassonografia abdominal e testicular, quando havia, e radiografia torácica antes dos procedimentos cirúrgicos

Sempre que necessário e possível, os animais foram submetidos à tomografia computadorizada previamente às cirurgias. O exame tomográfico foi executado pelo Serviço de Diagnóstico por Imagem do Departamento de Cirurgia, junto ao HOVET – FMVZ – USP, com equipamento helicoidal de 16 canais da marca Philips (Philips Mx 8000).

No exame tomográfico foi avaliado grau de vascularização tumoral de acordo com o grau de contraste (muito, pouco), atenuação tumoral (homogêneo ou heterogêneo), presença ou não de clivagem com estruturas adjacentes (ossos da pelve, musculatura intrapélvica, glúteo, uretra, reto e cauda). Foram analisados também os linfonodos sacrais, aórticos lombares e ilíacos quanto ao seu tamanho e atenuação (homogêneo ou heterogêneo).

4.5 EXAME TERMOGRÁFICO

O exame termográfico da região perianal foi realizado por meio da câmera FLIR T650sc (câmera termográfica *wi-fi*, com resolução de 307,000 pixels, sensibilidade de 30mK). As aferições de temperatura ocorreram dentro do centro cirúrgico, ambiente fechado, sem corrente de ar, sem janelas, e com temperatura regulada por ar condicionado. Em adição, as condições de temperatura e umidade relativa do ambiente foram mensuradas e corrigidas posteriormente por meio de *software* (Flir Research IR). As imagens dos tumores perianais foram captadas 15

minutos após a tricotomia do local e antes do procedimento cirúrgico. Todas as imagens foram captadas a mesma distância (0,5m) do animal e sob as mesmas condições.

Os dados foram analisados por meio de Software¹ específico e mensurados os seguintes parâmetros:

- Temperatura no ponto central da formação (SpT);
- Temperatura em ponto distante da formação (SpNT);
- Área elipsoide abrangendo a formação (AT);
- Área elipsoide em um ponto mais distante da formação (ANT)

Os valores de cada parâmetro foram computados para posterior análise estatística.

4.6 EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO

4.6.1 Reação imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Patologia da FMVZ (Lapmol). O procedimento imuno-histoquímico foi utilizado para determinar o índice de proliferação celular (ki-67), densidade microvascular (CD-31) e imunoexpressão do fator do endotélio vascular (VEGF).

Para a confecção das reações foram utilizados cortes histológicos de 5 µm dos tecidos tumorais colocados em lâminas silanizadas. As lâminas passaram pelo processo de desparafinização através de três banhos de xilol por 5 minutos cada, em seguida, realizou-se a hidratação por meio de três banhos de álcool 100%, seguidos de banhos com álcool 90%, 70%, água corrente e três banhos com água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada sob aquecimento em panela de pressão para os marcadores Ki-67 e VEGF. Para o VEGF foi utilizado tampão de citrato pH 6 e seis minutos de aquecimento, já para o Ki-67 foi utilizado o tampão Tris-EDTA pH 9 e 20 minutos de aquecimento. Para o CD-3 foi efetuada a recuperação enzimática com proteinase K durante seis minutos. Após o resfriamento, as lâminas foram imersas em peróxido de hidrogênio 10 volumes e incubadas durante 30 minutos à 37°C para o bloqueio da peroxidase endógena. Decorrido o

ZANUTO, E. B. M.

tempo, as lâminas foram lavadas durante 10 minutos em água corrente e foram realizados três banhos rápidos de água destilada, seguidos de um banho de TTBS (tris-buffered saline 50mM = 0,05% de tween 20, pH 7,6) sob agitação por cinco minutos. Após as lavagens foi realizado o bloqueio das reações inespecíficas em *Protein Block* (Novocastra, Leica Biosystems), as lâminas foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e lavadas novamente três vezes com TTBS sob agitação durante cinco minutos.

O Ki-67 sofreu um segundo bloqueio de reações inespecíficas com leite 5% (Molico Desnatado Nestlè) diluído em PBS, as lâminas ficaram incubadas em estufa à 37°C durante 30 minutos, posteriormente realizou-se a lavagem três vezes com TTBS sob agitação durante cinco minutos. Os cortes histológicos foram incubados com os anticorpos primários (descritos no quadro 4) diluídos em tampão PBS (phosphate buffered saline sem tween 20), em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos e por 16 horas a 4°C em geladeira.

Após este período, foi realizada a lavagem das lâminas com TBS (tris-buffered saline) pH 7,6 por cinco minutos sob agitação. O anticorpo pós primário (Novocastra, Leica Biosystems) foi adicionado e os cortes foram incubados em temperatura ambiente durante 30 minutos para VEGF e CD-31, e 15 minutos para Ki-67. Em seguida, foi feita a lavagem com 3 banhos de TBS por cinco minutos sob agitação para então, a incubação das lâminas com novolink Polymer durante 30 minutos em estufa à temperatura de 23-25°C. Realizado novo banho com TBS, três vezes por cinco minutos sob agitação.

A revelação dos antígenos foi realizada com o cromógeno tetracloreto de 3-3' diaminobenzidina (DAB, Novocastra, Leica Biosystems) por cinco minutos. Após lavagens em água corrente e destilada, foi feita a contracoloração com hematoxilina de Harris (Merck) durante 5 minutos, as lâminas foram então lavadas em água corrente por 10 minutos e receberam dois banhos de água amoniacal 0,5%, após lavagem de cinco minutos em água corrente e três banhos em água destilada, foi realizada a desidratação do tecido através da sequência inversa à de desparafinização e hidratação. Ao término, montou-se as lâminas utilizando Bálsamo do Canadá diluído em xilol cobertas por lamínulas.

Quadro 4: Marcadores imuno-histoquímicos e suas respectivas condições metodológicas.

Marcador	Marca	Clone	Tampão e condições de desmascaramento	Diluição do anticorpo
Ki-67	Dako (Cod. M7240)	MIB-1	EDTA (pH 9,0) - Panela de pressão elétrica, 125°C, 20 minutos	1:500
VEGF	Invitrogen (Cod.MA5-3182)	JH 121	Citrato (pH 6,0) - Panela de pressão elétrica, 125°C, 5 minutos	1:100
CD-31	Dako (Cod. M0823)	JC 10 A	Proteinase K, 37°C, 6 minutos	1:50

Fonte: Lapmol FMVZ - USP

4.6.2 Avaliação imuno-histoquímica

Para determinação do índice de proliferação celular (Ki-67) foi utilizada técnica manual de contagem dos núcleos positivos, em um total de 1000 células tumorais. Os resultados foram apresentados em percentagem (%).

A determinação da densidade microvascular foi realizada nos cortes histológicos submetidos à reação imuno-histoquímica para CD31, nos quais foram contados qualquer vaso, célula ou grupo de células positivas para este marcador. Os resultados foram apresentados como número de vasos por área, em μm^2 (Raposo et al., 2015). A quantificação foi realizada nas regiões com maior visualização de células positivas (“hotspots”), em pelo menos 10 campos histológicos obtidos em aumento de 400 $\times$ (objetiva de 40 $\times$), com o auxílio do sistema computadorizado de imagens Image-ProPlus, versão 4.5 (Media Cybernetics Inc).

Para determinar o grau de imunoexpressão do VEGF, os tumores foram avaliados de acordo com a sua intensidade de marcação citoplasmática. Resumidamente, foi adotada a seguinte classificação semi-quantitativa: grau 0 (ausência de marcação), grau 1 (marcação discreta), grau 2 (marcação moderada) e grau 3 (marcação intensa) (CAMACHO et al., 2014).

4.7 QUIMIOTERAPIA METRONÔMICA

Para os pacientes dos grupos II e IV foi proposto o protocolo quimioterápico com ciclofosfamida e piroxicam, iniciando o tratamento 21 dias após o procedimento cirúrgico aproximadamente. Os pacientes foram tratados, na dose de 15mg/m²/Sid de ciclofosfamida, e piroxicam na dose de 0,3mg/kg/Sid durante 6 meses. O protocolo adotado neste trabalho foi baseado nos estudos de Burton et al. (2011) e Marchetti et al. (2011).

4.8 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE QUIMIOTERÁPICA

A toxicidade quimioterápica foi classificada em: 1 leve, 2 moderada, 3 grave, 4 com risco de óbito, 5 óbito. Esta classificação foi realizada de acordo com os critérios de avaliação de toxicidade adaptada para cães – *Common Terminology Criteria for Adverses Events (VCOG, 2011)*.

Os pacientes dos grupos II e IV foram avaliados 15 dias após o início da quimioterapia por via oral, sendo avaliados mensalmente durante seis meses após este período. A toxicidade hematológica foi avaliada mediante hemograma. As toxicidades hepática e renal foram avaliadas por meio de dosagem sérica de ureia, creatinina, fosfatase alcalina (FA) e alanina transferase (ALT).

Para análise de toxicidade gastrointestinal, foi entregue aos tutores um questionário contendo 12 questões objetivas a respeito de alterações como êmese, diarreia, hiporexia, dentre outros (MALONE, et al., 2011, MIRANDA, 2017). Os questionários foram respondidos pelos tutores em cada retorno após 15 dias do início da quimioterapia. O modelo de questionário está contido no anexo A.

5. RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO CLÍNICO-CIRÚRGICO

Durante o período de agosto de 2015 a novembro de 2018 (39 meses) foram atendidos 80 animais com o diagnóstico confirmado de neoplasia na região perianal por exame histopatológico. Não obtivemos casos de epitelomas circum-anaís e adenomas apócrinos do saco anal durante o período de coleta de dados, portanto, esses tipos tumorais não entraram no projeto. Sendo assim, foram contabilizados somente casos de adenomas e adenocarcinomas circum-anaís e adenocarcinomas apócrinos de saco anal. O grupo AGCA foi constituído de 42 animais, sendo oito fêmeas e 34 machos. O grupo ACGCA, 33 animais, sendo uma fêmea e 32 machos e o grupo ACASA foi composto por cinco cães, sendo quatro fêmeas e um macho. Os machos foram os mais acometidos, representando 83, 75% do total de animais.

A média de idade geral dos pacientes foi de 11,43 anos (mínimo de 8 meses e máximo de 18 anos). A média de idade do grupo AGCA foi de 11,63 anos (8 meses a 18 anos), do grupo ACGCA foi de 11,02 anos (6 a 14 anos), e do grupo ACASA foi de 12,4 anos (10 a 14 anos).

No grupo AGCA os cães sem raça definida foram os mais acometidos (38,09%), seguidos pelas raças: Poodle (16,66%), Dachshund (11,90%), Yorkshire (7,14%), Lhasa Apso (4,76%), Shih Tzu (4,76%), Golden Retriever (2,38%), Collie (2,38%), Cocker Spaniel Inglês (2,38%), Border Collie (2,38%), Beagle (2,38%), Buldogue Inglês (2,38%), Chow Chow (2,38%). No grupo ACGCA os animais sem raça definida também foram os mais acometidos (42,42%), seguidos pelas raças: Poodle (15,15%), Dachshund (9,09%), Labrador (6,06%), Shih Tzu (6,06%), Fox Paulistinha (6,06%), Lhasa Apso (3,03%), Boxer (3,03%), Cocker Spaniel (3,03%), Golden Retriever (3,03%) e Akita (3,03%). No grupo ACASA, houve dois sem raça definida (60%), um Cocker Spaniel (20%) e um Basset Hound (20%).

Todas as fêmeas do estudo eram castradas. No grupo AGCA e ACGCA oito machos eram castrados. Nos animais do grupo ACASA, o único macho do grupo não era castrado.

No grupo AGCA, nove animais possuíam mais que um adenoma no momento do diagnóstico, os demais apresentaram um único nódulo. No grupo ACGCA, sete cães exibiram de 2 a 3 nódulos em região perianal, e os demais um nódulo único. No grupo ACASA, apenas um animal teve acometimento bilateral da glândula apócrina do saco anal.

Nove animais AGCA e 21 ACGCA apresentaram ulceração tumoral no momento do diagnóstico. Quatro do grupo ACGCA e quatro do grupo ACASA possuíam tenesmo devido ao tamanho das formações que comprimiam a porção final do reto. Somente o cão C19 (grupo ACASA) tinha ulceração no momento do diagnóstico. Os dados dos pacientes estão resumidos na tabela 1.

O estadiamento clínico foi realizado em cada grupo. No grupo AGCA, 53,38% dos pacientes foram classificados como T1N0M0, 45,24% como T2N0M0 e 4,76% como T3N0M0 (Gráfico 1). No grupo ACGCA, os animais com estadiamento T2N0M0 foram a maioria, representando 42,42% do total, seguido pelo estadiamento T1N0M0 com 24,24% do total (Gráfico 2). No grupo ACASA, os cães com estadiamento T4N0M0 representaram 40% do total (Gráfico 3) e segundo o estadiamento de Polton; Brearley (2007), dois animais estavam no estágio 2, e três cães no estágio 4 no momento do diagnóstico.

Na maioria dos casos deste estudo foram obtidas margens cirúrgicas livres, totalizando 92,5%. Cinco animais do grupo ACGCA apresentaram margens comprometidas por células neoplásicas e um cão do grupo ACASA. A complicação cirúrgica mais frequente foi a deiscência de ferida cirúrgica, ocorrendo em cinco (11,90%) animais do grupo AGCA, sete (21,21%) do grupo ACGCA e dois (40%) do grupo ACASA.

Nos cães C25 e C48 (grupo AGCA) foi necessária a remoção total do esfíncter anal externo, devido ao tamanho das formações e ulceração intensa. C25 apresentou intensa fibrose na região da ferida cirúrgica e estenose do orifício anal, sendo necessária uma cirurgia corretiva para remoção do tecido cicatricial e a realização da técnica de Zplastia bilateral para evitar a recorrência da estenose. Esses dois pacientes apresentaram incontinência fecal intermitente. Para o paciente C38 portador de múltiplos adenomas circum-anaís optou-se pela remoção de metade dos tumores e orquiectomia, em 180 dias, houve regressão de 100% das lesões.

No grupo ACGCA, os cães C8, C12 e C26 tiveram a ressecção total do ânus devido ao tamanho tumoral e grau de comprometimento de estruturas adjacentes, dessa forma foram obtidas margens cirúrgicas livres. Após o procedimento cirúrgico, C12 apresentou deiscência da ferida cirúrgica e cicatrização por segunda intenção, passando a ter estenose em ampola retal, sendo necessária a cirurgia corretiva com a técnica de Zplastia bilateral, após o segundo procedimento não houve mais estenose retal até o óbito do paciente. Os três animais ficaram incontinência fecal permanente. A figura 1 descreve transoperatório do cão C8 até a retirada dos pontos com 21 dias.

Figura 1- Procedimento cirúrgico referente ao paciente C8; (A) Neoplasia medindo 10,0x8,0x6,0cm, (B) Divulsão de pele, subcutâneo e musculatura; (C) Excisão da parede do reto; (D) Excisão completa da neoplasia; (E) Fechamento da ferida cirúrgica; (F) Cicatrização total após 21 dias.

No grupo ACASA, os cães C6 e C19 tiveram a ressecção total do ânus, seguida de deiscência da ferida cirúrgica. C19 foi eutanasiado em coleira a pedido do responsável, e C6 apresentou cicatrização por segunda intenção satisfatória no período de um mês. Em ambos os animais se conseguiu margens cirúrgicas livres, porém ambos desenvolveram incontinência fecal permanente.

Tabela 1 – Características clínicas- cirúrgicas de acordo com o tipo histológico.

Cão/Subgrupo/ Prontuário	Sexo	Idade (anos)	Raça	Número de formações	Medida em cm (LxAxP)	TNM	Histopatológico tumor	Complicações cirúrgicas
C1/II/213806	M	13	Labrador	2	1,5x1,5x2,0/1,0x1,5x1,0	T2N2BM0	ACGCA	Não
C2/III/237649	M	11	SRD	3	1,0x1,0x1,0/2,0x1,5x1/3,0x2,0x2,0	T2N0M0	ACGCA	Não
C3/III/251836	M	13	SRD	3	5,0x4,0x4,0/1,0x1,0x1,0/1,0x1,0x1,0	T2N2bM0	ACGCA	Não
C4/I/248208	F	11	SRD	1	0,7x0,7x0,5	T1N0M0	AGCA	Não
C5/I/158009	M	13	Poodle	1	1,0x1,0x1,0	T1N0M0	AGCA	Não
C6/IV/251753	M	13	SRD	1	7,0x5,5,0x10,0	T4N0M0	ACASA	Sim
C7/I/250587	M	11	SRD	1	0,5x0,5x0,3	T1N0M0	AGCA	Não
C8/III/247729	M	11	Dachshund	1	10,0x8,0x6,0	T4N2bM1	AGGCA	Sim
C9/I/252128	M	12	Collie	2	5,0x3,0x3,0/1,0x1,5x2,0	T2N0M0	AGCA	Não
C10/IV/252639	F	12	Cocker	1	1,0x1,5x1,0	T1N2bM1	ACASA	Não
C11/I/189647	M	13	Cocker	1	1,5x1,4x1,3	T1N0M0	AGCA	Não
C12/III/247446	M	14	SRD	1	10,0x7,0x4,0	T4N2bM1	ACGCA	Sim
C13/I/248904	M	12	Dachshund	1	3,0x3,0x2,0	T2N0M0	AGCA	Não
C14/I/248177	M	8m	Golden	1	5,0x5,0x3,0	T2N0M0	AGCA	Não
C15/I/225507	M	12	Dachshund	1	1,0x2,0x1,0	T1N0M0	AGCA	Não
C16/I/249181	F	11	SRD	1	1,6x1,4x1,2	T1N0M0	AGCA	Não
C17/II/248268	M	9	SRD	1	2,0x2,0x2,0	T2N2bM1	ACGCA	Não
C18/I/247855	M	10	SRD	1	1,5x1,5x1,0	T1N0M0	AGCA	Não
C19/IV/251528	F	10	Basset Hound	1	10,0x6,0x9,0	T4N0M0	ACASA	Sim
C20/II/232144	M	10	SRD	1	1,5x2,0x5,0	T2N0M0	ACGCA	Não
C21/I/246110	M	9	Dachshund	1	2,3x3,0x4,0	T2N0M0	AGCA	Sim
C22/I/241820	F	11	SRD	1	1,4x1,4x1,5	T1N0M0	AGCA	Não
C23/I/247840	F	12	SRD	1	3,5x2,5x1,5	T2N0M0	AGCA	Não
C24/IV/253914	F	13	SRD	1	2,0x1,5x1,0	T2N2bM1	ACASA	Não
C25/I/254804	M	13	SRD	5	6,0x5,0x2,0/1,0x0,5x0,5...	T3N0M0	AGCA	Não
C26/III/253212	M	11	Shih Tzu	4	1,0x1,0x1,6/3,0x1,6x1,2,0...	T2N0M0	ACGCA	Não
C27/III/241517	M	13	SRD	1	6,0x5,5x4,0	T4N2bM0	ACGCA	Não
C28/III/185720	M	14	Dachshund	1	1,5x1,1x1,0	T1N0M0	ACGCA	Não
C29/II/257717	M	10	SRD	1	1,5x1,5x1,5	T1N0M0	ACGCA	Não
C30/III/251838	M	14	SRD	1	3,5x3,0x2,0	T2N2bM0	ACGCA	Não
C31/II/251675	M	14	SRD	1	4,0x3,0x3,0	T2N0M0	ACGCA	Não
C32/I/252600	M	18	Poodle	2	4x1,5x3/1x1,5x1	T2N0M0	AGCA	Não
C33/I/225271	M	11	Beagle	1	2,0x1,5x2,0	T2N0M0	AGCA	Sim
C34/II/254030	M	12	Fox Paulistinha	1	2,5x1,5x1,5	T2N0M0	ACGCA	Sim
C35/II/254187	M	9	Akita	1	3,5x3,5x2,0	T2N0M0	ACGCA	Sim
C36/II/230338	M	6	Boxer	1	0,3x0,3x0,3	T1N0M0	ACGCA	Não
C37/I/215965	M	11	SRD	1	1,5x2,0x1,0	T1N0M0	AGCA	Não
C38/I/253839	M	13	Lhasa Apso	3	3,5x3,0x2,0/1,5x1,0x1,5/1,0x0,5x1,0	T2N0M0	AGCA	Não
C39/II/253806	M	12	Poodle	1	1,2x1,1x0,8	T1N0M0	ACGCA	Não
C40/I/147796	M	13	SRD	1	3,0x3,0x2,0	T2N0M0	AGCA	Não
C41/II/256174	M	11	SRD	2	6,5x4,4x3,0/1,5x1,5x1,0	T3N0M0	ACGCA	Não
C42/II/255890	M	12	Poodle	2	1,5x0,3x0,3/0,3x0,3x0,3	T1N0M0	ACGCA	Não
C43/II/186862	M	10	SRD	1	2,0x2,5,1,5	T2N0M0	ACGCA	Não
C44/II/242722	M	11	Lhasa Apso	1	3,0x3,0x3,0	T2N0M0	ACGCA	Não
C45/I/174233	F	12	Poodle	1	1,5x1,0x1,5	T1N0M0	AGCA	Não
C46/I/244105	M	9	Border Collie	1	1,5x1,0x0,5	T1N0M0	AGCA	Não
C47/I/257245	M	14	SRD	1	2,5x2,0x1,0	T2N0M0	AGCA	Não
C48/I/258551	M	12	SRD	2	5,1x4,0x3,0/2,0x1,5x1,0/0,5x0,5x1,0	T3N0M0	AGCA	Sim
C49/I/247674	M	16	Poodle	1	1,0x1,0x0,6	T1N0M0	AGCA	Não
C50/I/246536	M	13	Dachshund	1	1,5x1,5x1,5	T1N0M0	AGCA	Não
C51/II/258472	M	9	Shih Tzu	1	1,5x1,5x0,9	T1N0M0	ACGCA	Não
C52/II/256511	M	9	Poodle	1	1,5x1,5x0,9	T1N0M0	ACGCA	Não
C53/I/258340	M	9	Lhasa Apso	1	0,5x0,5x0,5	T1N0M0	AGCA	Não
C54/I/260067	M	11	SRD	2	1,0x1,0x1,0/0,5x0,5x0,5	T1N0M0	AGCA	Não
C55/I/259974	M	13	Poodle	1	3,5x4,5x3,2	T2N0M0	AGCA	Não
C56/I/259250	M	13	Poodle	2	1,3x1,2x1/0,5x0,7x0,2	T1N0M0	AGCA	Não
C57/I/258442	M	11	Dachshund	1	0,8x1,0x1,5	T1N0M0	AGCA	Não
C58/I/260272	M	9	Shih Tzu	1	2,0x2,0x0,8	T2N0M0	AGCA	Não
C59/I/138570	M	16	Yorkshire	1	2,5x2,0x1,3	T2N0M0	AGCA	Não
C60/I/252251	F	12	Yorkshire	1	2,5x2,0x1,3	T2N0M0	AGCA	Não
C61/I/261703	M	11	Chow Chow	1	0,7x0,5x0,2	T1N0M0	AGCA	Não
C62/I/258211	M	13	Shih Tzu	1	1,0x1,0x0,7	T1N0M0	AGCA	Não
C63/I/262484	M	10	Poodle	1	1,0x1,0x0,8	T1N0M0	AGCA	Não
C64/II/263114	M	9	Labrador	1	1,0x1,5x0,5	T1N0M0	ACGCA	Não
C65/II/255186	M	12	SRD	1	10,7x7,7x8,5	T4N2bM0	ACGCA	Sim
C66/I/264192	M	12	SRD	2	2x2,5x2/2,5x2,5x2,8	T2N0M0	AGCA	Não

C67/II/264193	F	13	Cocker Spaniel	1	2,1x2,7x1,6	T2N0M0	ACGCA	Não
C68/II/263705	M	11	SRD	1	2,2x2,1x1,7	T2N0M0	ACGCA	Não
C69/III/263814	M	12	Poodle	1	3,0x2,9x2,1	T2N0M0	ACGCA	Não
C70/I/215268	F	8	SRD	1	4,0x3,5x3,2	T2N0M0	AGCA	Não
C71/II/259348	M	13	Golden	2	5,0x3,5x2,5/1,8x1,5x1,1	T3N2bM0	ACGCA	Não
C72/II/265376	M	13	Fox	1	3,3x2,2x1,5	T2N0M0	ACGCA	Não
C73/II/265808	M	11	Dachshund	2	3,0x2,0x1,0/0,7x0,6x0,5	T2N0M0	ACGCA	Sim
C74/I/181904	F	17	Yorkshire	1	1,0x1,0x0,9	T1N0M0	AGCA	Não
C75/III/265775	M	6	SRD	1	2,7x2,0x1,5	T2N0M0	ACGCA	Não
C76/I/266327	M	10	SRD	1	4,1x3,4x4,3	T2N0M0	AGCA	Sim
C77/IV/266205	F	14	SRD	1	8,5x4,9x4,8	T4N2bM1	ACASA	Não
C78/I/260617	M	11	Bulldog inglês	1	4,2x3,3x2,7	T2N0M0	AGCA	Não
C79/I/267124	M	10	SRD	1	2,0x1,7x1,5	T2N0M0	AGCA	Sim
C80/II/258347	M	6	Poodle	1	3,0x2,0x1,5	T3N0M0	ACGCA	Sim

C – cão, M – Macho, F – Fêmea, m – meses, T1: tumor < 2cm, superficial, não aderido, T2: tumor 2 a 5cm, ou pouco aderido independente do tamanho, T3: tumor >5cm, ou com invasão de subcutâneo independente do tamanho, T4: tumor invadindo outras estruturas como fáscia, músculo, osso ou cartilagem, N0: sem evidências de metástase, N1: linfonodos ipsilaterais móveis, N1a: linfonodos de tamanho normal, N1b: linfonodos aumentados, N2: linfonodos contralaterais ou bilaterais móveis, N2a: linfonodos de tamanho normal, N2b: linfonodos aumentados, M0: sem evidências de metástase à distância, M1: presença de metástases à distância, AGCA – Adenoma de glândula circum-anal, ACGCA - Adenocarcinoma de glândula circum-anal, ACASA – Adenocarcinoma apócrino de saco anal.

Gráfico 1 – Estadiamento clínico TNM do grupo AGCA.

Gráfico 2 – Estadiamento clínico do grupo ACGCA.

Gráfico 3 – Estadiamento clínico do grupo ACASA.

5.2 ESTUDO CITOLÓGICO-HISTOPATOLÓGICO

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) dos tumores foi realizada em 72 animais, tendo como resultados cinco tipos de diagnósticos diferentes e suas respectivas frequências conforme tabela 2. O exame histopatológico foi realizado em 80 amostras, a frequência absoluta e relativa dos tumores perianais encontra-se na tabela 3. A análise citológica não foi realizada em oito cães, pois os responsáveis não enviaram as amostras ao laboratório, por este motivo os cães que realizaram o exame histopatológico, sem ter feito o citológico, foram descartados dessa análise.

Tabela 2 - Resultados da citologia.

Resultado Citologia	Freq. Rel.	Freq. Rel.
Adenoma	15	20,83%
Carcinoma	45	62,50%
Cisto	1	1,39%
Inconclusivo	10	13,89%
Inflamação	1	1,39%
Total	72	100%

Fonte: a autora

Legenda: Freq. Abs.: Frequência absoluta. Freq. Rel.: Frequência relativa

Tabela 3 - Resultados dos exames histopatológicos dos três grupos.

Resultado Histopatológico	Freq. Abs.	Freq. Rel.
ACASA	5	6,25%
ACGCA	33	42,50%
AGCA	42	51,25%
Total	80	100%

Fonte: a autora

Legenda: Freq. Abs.: Frequência absoluta. Freq. Rel.: Frequência relativa

O exame citológico não diferenciou os adenocarcinomas de glândula circum-anal dos adenocarcinomas de glândula apócrina do saco anal, sendo ambos classificados como carcinomas. Das 42 amostras confirmadas pelo exame histopatológico como adenoma de glândula circum-anal, treze demonstraram correlação positiva na citologia para este tumor. Das 33 amostras histopatológicas de adenocarcinoma de glândula circum-anal, vinte e duas tiveram correlação positiva com a citologia. E das cinco amostras histopatológicas de adenocarcinoma apócrino do saco anal, quatro mostraram correlação positiva com a citologia. Dez amostras citológicas foram classificadas como inconclusivas, uma como inflamação e outra como cisto. Das amostras inconclusivas, quatro foram histologicamente classificadas como adenomas circum-anais, cinco como adenocarcinomas de glândulas circum-anais e uma como adenocarcinoma apócrino de saco anal (tabela 4).

Tabela 4 – Estudo relação citologia – histopatológico em números absolutos.

Exame		Histopatológico		
		ACASA	ACGCA	AGCA
Citologia	Adenoma	0	2	13
	Carcinoma	4	22	19
	Cisto	0	1	0
	Inconclusivo	1	4	5
	Inflamação	0	1	0

Fonte: a autora

Os tumores classificados como Adenoma tiveram uma proporção de acerto de 86,67% em relação ao histopatológico, conforme tabela 5. Já os tumores classificados como Carcinoma na citologia tiveram uma proporção de acerto de 57,78% com o resultado do exame histopatológico (tabela 6).

Tabela 5 – Citologia – Histopatológico demonstrando a porcentagem de erro e acerto para o diagnóstico citológico de Adenoma.

Citologia – Histopatológico	Frequência	Casos
Adenoma – AGCA	86,67%	13
Acerto	86,67%	13
Adenoma – ACGCA	13,33%	2
Adenoma – ACASA	0,00%	0
Erro	13,33%	2

Fonte: a autora

Tabela 6 – Citologia – Histopatológico demonstrando a porcentagem de erro e acerto para o diagnóstico citológico de Adenocarcinoma.

Citologia – Histopatológico	Frequência	Casos
Carcinoma – ACASA	8,89%	4
Carcinoma – ACGCA	48,89%	22

Acerto	57,78%	26
Carcinoma – AGCA	42,22%	19
Erro	42,22%	19

Fonte: a autora

Para estimar a correlação entre o resultado da citologia e o respectivo histopatológico foi utilizada a seguinte equação:

$$histopatológico_i = \alpha.citológico_i c + \varepsilon$$

A variáveis histopatológico e citológico foram definidas teoricamente como adenoma (AGCA) = 1, carcinoma (ACGCA, ACASA) = 2 e não neoplásicos (cisto, inconclusivo, inflamação) = 0. Para obtermos a correlação, estimou se a equação acima por meio do método dos mínimos quadrados ordinários (GREENE, 2012). Os resultados estão expostos na tabela 7:

Tabelas 7 – Correlação Citologia – Histopatológico – Método MQO.

Hispatológico	
Citológico	0,815
	(0,058)***
Núm. de obs. = 72	
R ₂ = 0.733	
*** Nível de sig. de 0,01	

Fonte: a autora

A estimativa de correlação parcial obtida foi de 0,815, sendo estatisticamente significativa a 1% de acordo com o teste t-student. O intervalo de confiança de 95% é de 0,699 a 0,932.

Além disso, estimou-se também um teste Wald para a hipótese de que $\alpha = 1$, ou seja, caso em que há correlação perfeita entre os exames. Contudo, a hipótese que foi rejeitada a 0,01% [F(1,71)=9,96], o que é esperado dado o resultado do intervalo de confiança.

5.3 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO TESTICULAR

O exame histopatológico dos testículos foi realizado em todos os cães inteiros, em um total de 51 animais. Destes, 17 não apresentaram alterações, em oito cães havia degeneração testicular em pelo menos um testículo e os demais apresentaram pelo menos um tipo tumoral, dois cães possuíam Leydigoma e Seminoma. O tumor de células intersticiais Leydigoma foi o mais frequente, seguido do Seminoma e do Sertolinoma, conforme ilustrado no gráfico 4.

Gráfico 4 – Frequência em porcentagem dos tumores testiculares nos três grupos (AGCA, ACGCA e ACASA).

Fonte: a autora

Os tumores testiculares foram mais prevalentes no grupo ACGCA, sendo o leydigoma o com maior número de casos, 35,71% dos cães. Este tipo histológico também foi mais frequente nos adenomas e foi encontrado no único macho do grupo ACASA (tabela 8).

Tabela 8 – Distribuição dos casos - formações testiculares e os tumores perianais.

	Leydigoma	Seminoma	Sertolinoma	Total
ACASA	1 3,57%	0 0,00%	0 0,00%	1 3,57%
ACGCA	10 35,71%	4 14,29%	3 10,71%	17 60,71%
AGCA	6 21,43%	3 10,71%	1 3,57%	10 35,71%
Total	17 60,71%	7 25,00%	4 14,29%	28 100.00

Fonte: a autora

Na tabela 9 estão expostas as estimativas de correlação. Não se encontrou correlação estatisticamente significativa entre as formações testiculares e os tumores perianais.

Tabelas 9 – Matriz de Correlações.

	Leydigoma	Sertolinoma	Seminoma
ACGCA	0,032	0,149	-0,007
ACASA	0,146	-0,085	-0,121
AGCA	-0,090	-0,118	0,055

*Nível de sig. de 0,01

Fonte: a autora

5.4 AVALIAÇÃO DO CÁLCIO IÔNICO

Todos os animais que participaram desse estudo não apresentaram aumento nos níveis séricos de cálcio iônico.

5.5 AVALIAÇÃO DOS EXAMES DE IMAGEM (ULTRASSONOGRAFIA, RADIOGRAFIA E TOMOGRAFIA)

O animal C12, pertencente ao grupo ACGCA, apresentou nodulações pulmonares no momento do diagnóstico, sendo dois nódulos circunscritos, estes nódulos se mantiveram estáveis até 6 meses após o término da terapia, após este período houve crescimento progressivo até o óbito do paciente. O cão C10 (grupo ACASA) possuía alterações compatíveis com lise óssea em duas costelas e em vértebra lombar (L1).

Ao exame ultrassonográfico do grupo AGCA, a alteração testicular foi a mais frequente, presente em 15 animais. Em cinco cães havia presença de nódulos hepáticos; em oito, de nódulos esplênicos e; em três, aumento de linfonodos ilíacos, porém sem heterogeneidade.

No grupo ACGCA, cinco pacientes possuíam linfonodos ilíacos mediais aumentados, em três deles, os ilíacos também eram heterogêneos. Quatro animais tinham fígado com ecogenicidade grosseira, e dois deles tinham nódulos hepáticos. Seis dos animais possuíam nódulos em baço. Neste grupo, 16 cães apresentaram pelo menos um nódulo testicular.

No grupo ACASA, um animal apresentou aumento e heterogeneidade de linfonodos ilíacos mediais e nódulos em baço, e outro apresentou formação intestinal heterogênea adjacente a alça. Um animal do grupo tinha nódulo em testículo esquerdo.

O exame tomográfico foi realizado em 15 animais para avaliação da neoplasia e dos linfonodos que drenam a região. O exame foi realizado em três cães do grupo AGCA, nove do ACGCA e três animais do grupo ACASA.

Todos animais avaliados do grupo AGCA não mostraram alterações morfológicas em linfonodos e nem comprometimento de estruturas adjacentes. Dois adenomas eram pouco vascularizados e homogêneos, porém um era heterogêneo e muito vascularizado.

No grupo ACGCA, quatro animais tiveram aumento de linfonodos sacrais e dois deles eram também heterogêneos; três cães apresentaram aumento também de linfonodos ilíacos e em um destes linfonodos evidenciou-se heterogeneidade. C12 possuía linfonodos sacrais normais, porém aumento de linfonodo ilíaco, ambos homogêneos. Em nenhum dos animais houve alterações em linfonodos aórticos abdominais.

Neste grupo, nenhum dos animais demonstrou comprometimento ósseo, mas em C8 e C12 a neoplasia possuía continuidade com os ossos da pelve, e nesses casos também não havia clivagem com o glúteo, com a musculatura intrapélvica, e com a cauda, em um deles também

não havia clivagem com a uretra. Em quatro cães a neoplasia não apresentou clivagem com o reto, e em outros três, não houve clivagem com a uretra membranosa. Em três animais o tumor era homogêneo e nos demais heterogêneos. Em C1, C17 e C20 o tumor se mostrou pouco vascularizado, nos outros seis, exibiu vascularização intensa.

No grupo ACASA, C6 possuía todos os linfonodos aumentados e homogêneos, e nos demais animais, todos estavam normais e homogêneos. Em nenhum cão houve comprometimento ósseo, porém em C6 houve continuidade tumoral com ossos da pelve. Em C24 havia clivagem com o glúteo, nos demais não. Em C19 e C24, não havia clivagem entre o tumor e a uretra. Nenhuma formação exibiu clivagem com o reto. Em C6 e C19, as formações não apresentavam clivagem com a musculatura intrapélvica e em C19 e C24 não tinham clivagem com a uretra. Em dois animais, o tumor mostrou-se muito vascularizado e heterogêneo. Os dados da TC encontram-se resumidos no quadro 5.

Quadro 5 – Análise tomográfica dos animais dos subgrupos I, II, III e IV.

Cão n°/ Grupo	Linfonodos Sacrais	Linfonodos Aórticos L.	Linfonodos Ilíacos	Compro. ósseo	Contin. Osso	Clivagem Glúteo	Clivagem Cauda	Clivagem Reto	Clivagem. Musc.	Clivagem Uretra	Atenuaç. tumor	Vasculari-zação
C14/I/248177	n, ho	n, ho	n, ho	não	não	sim	sim	não	não	sim	ho	Pouco
C15/I/225507	n, ho	n, ho	n, ho	não	não	sim	sim	não	não	não	ho	Pouco
C48/I/258551	n, ho	--	n, ho	não	não	sim	sim	não	sim	sim	ht	Muito
C1/II/213806	a/ho	n, ho	a/ho	não	não	sim	sim	sim	sim	não	ho	Pouco
C17/II/248268	n, ho	n, ho	n, ho	não	não	sim	sim	não	sim	sim	ht	Pouco
C20/II/232144	n, ho	n, ho	n, ho	não	não	sim	sim	sim	sim	sim	ho	Pouco
C36/II/254187	n, ho	n, ho	n, ho	não	não	sim	sim	não	sim	sim	ho	Muito
C41/II/256174	n, ho	--	n, ho	não	não	sim	não	sim	sim	sim	ht	Muito
C8/III/247729	a/ht	n, ho	a/ho	não	sim	não	não	sim	não	não	ht	Muito
C12/III/247446	n, ho	n, ho	a/ho	não	sim	não	não	sim	não	sim	ht	Muito
C26/III/253212	a, ho	n, ho	n, ho	não	não	sim	sim	não	sim	sim	ht	Muito
C27/III/241517	a, ht	n, ho	a, ht	não	não	sim	sim	não	não	não	ht	Muito
C6/IV/251753	a/ho	a/ho	a/ho	não	sim	não	não	não	não	não	ht	Muito
C19/IV/251528	n, ho	n, ho	n, ho	não	não	não	não	não	não	sim	ht	Muito
C24/IV/253914	n, ho	n, ho	n, ho	não	não	sim	sim	não	sim	sim	ho	Pouco

Legenda – Linfonodos Aórtico L. = Linfonodos Aórticos Lombares, Compro. Ósseo = Comprometimento ósseo, Contin. Osso = Continuidade óssea, Clivagem musc. = Clivagem com musculatura intrapélvica, Atenuaç tumor=Atenuação tumoral, n= normal, ho=homogêneo, ht=heterogêneo, -- não contemplado.

Fonte: a autora

5.6 EXAME TERMOGRÁFICO

A termografia da região perianal foi realizada em 51 animais dos grupos AGCA e ACGCA; dos quais 31 adenomas circum-anais, e 20 adenocarcinomas circum-anais. E em um animal do grupo ACASA. Foram mensurados: temperatura do ponto central do tumor (SpT), temperatura de ponto distante da margem cirúrgica (SpNT), temperatura máxima, mínima e média de área tumoral (AT) e área correspondente não tumoral (ANT).

As análises termográficas dos tumores de glândulas circum-anais e tumor de glândula apócrina do saco anal são mostradas na tabela 10.

A Figura 2 mostra as imagens termográficas com as respectivas mensurações de temperatura em Spt, SpNT, AT e ANT, e suas respectivas imagens em padrão normal, não termográficas.

Para a comparação das diferenças entre as médias de temperaturas de adenomas e adenocarcinomas, e o esfíncter anal sadio, empregamos um teste t - Student, levando-se em conta o número diferente de observações de cada grupo, assim como, possível heterocedasticidade. Testes foram calculados seguindo ACOCK (2014) e implementados usando-se o software Stata – versão 14.

Figura 2 - Imagem termográfica com as marcações de SpT (Sp1), SpNT (Sp2), AT (E1), ANT (E2), dos seguintes cães: A - C50-AGCA; C - C28-ACGCA; E - C19-ACASA. Imagem em padrão normal - não térmico, dos pacientes: B - C50-AGCA; D - C28-ACGCA; F - C19-ACASA.

Tabela 10 - Análises termográficas dos tumores perianais deste estudo.

Animal No	Hpt	Spt	SpNT	Max AT	Min AT	MediaAT	MaxANT	MinANT	MediaANT
A2	ACGCA	32,1	37,3	35,9	30,5	33,4	37,6	36,1	37,2
A3	ACGCA	35,5	36,8	36,7	33,8	35	37,3	35,5	36,7
A7	AGCA	37,6	37,8	38,3	37,1	37,8	38,8	36,6	37,8
A9	AGCA	37,7	37,5	38,9	37,1	38,3	38,3	36,3	37,6
A11	AGCA	26,7	34,1	30,2	27,9	29	34,2	29,2	32,6
A12	ACGCA	37,3	37,3	38,1	31,7	36,9	38,1	35,2	37,2
A13	AGCA	38,1	37,6	38,9	37,2	38	38,3	36,5	37,7
A14	AGCA	38,5	37,4	39,2	35,8	38,3	39,2	36,4	38,4
A15	AGCA	34,5	34,3	35,5	33,7	35,3	35,2	33,4	34,3
A16	AGCA	36,3	37,4	38	36,2	36,7	38,3	36,4	37,4
A17	ACGCA	37,4	36,3	38	35,5	37,3	37,4	33,9	35,9
A18	AGCA	34,5	33,8	36,2	34	34,7	35,2	33,2	34
A21	AGCA	36	38,2	37,9	34,5	35,8	40	34,6	37,1
A22	AGCA	38,2	38,3	39,4	37,5	38,5	39,4	37,5	38,5
A23	AGCA	37,8	37,7	39	35,4	37,8	39,2	35,7	37,8
A25	AGCA	34,7	38,6	39,7	30,1	36	40,3	33,1	38,1
A27	ACGCA	36,4	35,2	37,9	30,9	36,2	35,7	34,5	35,1
A28	ACGCA	33,3	36,9	35,6	32,3	32,3	37,8	35,7	36,8
A29	ACGCA	36,2	37	37,3	24,4	32,1	37,1	33,6	35,8
A30	ACGCA	34,6	38,7	39,9	31,3	36,3	40,1	33,9	37,7
A32	AGCA	29,7	35,3	34,6	27	31,1	36,5	33,2	35,2
A33	AGCA	36,8	35,7	37,7	32,2	36,3	37,5	35,4	36,7
A34	ACGCA	37	35,4	37,5	33,3	36,2	37,6	32,5	35,2
A35	ACGCA	36,6	37	37	35,1	36,5	37	34,2	35,7
A36	ACGCA	34,5	36,7	37,2	33,4	35,2	37,4	34,3	36,7
A37	AGCA	32,7	31,6	33,9	30,5	32,9	32,9	30,7	31,9
A39	ACGCA	32,1	37,2	34,2	31,8	33	37,7	35,8	37
A40	AGCA	36,4	38,4	39,1	33,9	36,8	40,2	36,2	38,1
A41	ACGCA	36,3	36,7	37,1	33,4	36,2	37,3	34,9	36,5
A42	ACGCA	31,1	36,5	34,6	30,9	32,8	36,5	35,7	36,3
A43	AGCA	33,8	36,9	35,4	33,6	34,2	37,3	36,2	36,8
A44	ACGCA	37,2	37,4	38,1	37,2	35,7	37,8	32,5	37
A47	AGCA	37,6	38,1	38,5	36,2	37,6	38,8	37,2	38,3
A49	AGCA	33,7	34,9	35,4	32,2	33,9	35,2	34	34,7
A50	AGCA	30,4	36,5	30,3	26,5	32,4	37,1	35,1	36,6
A55	ACGCA	35,9	34,3	37	33,8	36	36,3	33,8	34,5
A57	AGCA	37,5	38,5	38	37,3	37,7	38,6	38,2	38,4
A58	AGCA	35,9	35,6	36,7	35,4	36	36,5	34,7	35,5
A59	AGCA	33	36,2	36,5	30,3	32,9	38,1	29,9	36,5
A60	AGCA	32,7	35,1	34,7	30	32,8	35,6	34,9	35,2
A62	AGCA	28,5	34,6	32,5	28,4	29,8	34,6	34	34,4
A66	AGCA	34	36,7	36,7	33,3	35	37,6	35,4	36,6
A67	ACGCA	34,6	36,3	37,3	30,8	34,3	37,7	32,7	35,8
A68	ACGCA	37,2	37,3	37,8	31,2	35,3	38,6	36,4	37,5
A70	AGCA	38,5	40,2	39,3	35,9	37,7	40,7	29,7	37,9
A71	ACGCA	32,9	37,2	37,1	29,6	33,5	37,8	26,4	37
A72	ACGCA	33,5	36,7	37,1	31,2	33,2	37,9	35	36,8
A73	ACGCA	37,6	37,7	38,2	36,5	37,5	38	37	37,6
A74	AGCA	36,2	37,4	37,9	35,4	36,6	37,9	36,7	37,3
A76	AGCA	37,2	37,5	39,9	34,7	37,7	38,8	34,5	37,6
A78	AGCA	35,8	35,7	36,5	35,1	36	36,3	34,7	35,8
A19	ACASA	38,2	37,5	39,1	31,8	37,9	38,2	36,0	37,1

Legenda: SpT = Ponto central do tumor; SpTN - Ponto em pele sadia; AT = área elipsóide da formação tumoral; ANT= Área elipsóide de pele sadia.

Fonte: a autora

Para os adenocarcinomas apócrinos do saco anal a diferença entre a média de SpT (38,20°C) e de SpNT (37,50°C) foi 0,7°C. Já a diferença da média AT (37,90°C) e ANT (37,10°C) foi 0,80°C. Não foi possível realizar a análise estatística tendo em vista a existência de apenas um caso.

Para os adenomas circum-anaís a diferença entre a média de SpT (35,06°C) e de SpNT (36,51°C) foi -1,45°C ($p < 0,01$) enquanto que a diferença da média AT (35,47°C) e ANT (36,42°C) foi -0,96°C ($p < 0,05$), sendo ambos os resultados estatisticamente significantes. Ou seja, os adenomas circum-anaís são mais frios do que o esfíncter não tumoral.

Para adenocarcinomas circum-anaís a diferença entre a média de SpT (35,17°C) e de SpNT (36,88°C) foi de -1,71°C ($p < 0,01$) ao passo que a entre AT (34,95°C) e ANT (36,57°C) foi de -1,69°C ($p < 0,01$), sendo ambos os resultados estatisticamente significantes. Assim, os adenocarcinomas circum-anaís também são mais frios do que o esfíncter não tumoral.

Comparando-se adenomas e adenocarcinomas circum-anaís a diferença SpT foi -0,10°C ($p = 0,87$), e a diferença AT foi de 0,52°C ($p = 0,38$).

Analisando-se as respectivas funções de densidade de probabilidade, verifica-se que os adenocarcinomas circum-anaís tendem a ter uma maior concentração de valores menores, como se observa nos gráficos 5 e 6. As respectivas curvas ACGCA estão sempre acima e à esquerda das AGCA. Conclui-se, que ambos os tumores são mais frios que o esfíncter saudável, porém um número significativo de adenocarcinomas circum-anaís é mais frio que os adenomas circum-anaís, sugerindo um potencial identificador para esses tumores malignos.

Gráfico 5 – Comparação entre as funções de densidade de probabilidade – AT

Gráfico 6– Comparação entre as funções de densidade de probabilidade – SpT

Por fim, para se determinar precisamente do ponto de vista estatístico o impacto das diferenças de temperatura na probabilidade de ser adenoma ou adenocarcinoma circun-anal, estimou-se a seguinte equação, por meio de um probit (GREENE, 2012), em que Φ_i é um indicador tumoral (1= ACGCA; 0=AGCA) :

$$\Phi_i = \beta_0 + \beta_1 \cdot (SpNT - SpT) + \beta_2 \cdot (ANT - AT) + \varepsilon$$

Observou-se assim um aumento da probabilidade (17,45%) de ser um adenocarcinoma circun-anal toda vez que se tem uma diferença de 1°C ou mais entre o tumor e o esfíncter saudável. Nota-se que a diferença no ponto central do tumor não é estatisticamente significativa, conforme tabela 11.

Tabelas 11 – Efeitos marginais em °C para a identificação do tipo tumoral.

	ACGCA
β_1	-0,107 (0,067)
β_2	0,1745 (0,087)**
Núm. de obs. = 51	
Pseudo-R ₂ = 0.06	
** Nível de sig. de 0,05	
Fonte: a autora	

5.7 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Dos 80 animais incluídos no estudo, a imuno-histoquímica foi realizada em 65 deles. O Ki-67 foi realizado em 60 cães, CD-31 e o VEGF em 63. A tabela 12 ilustra as marcações.

Tabela 12 – Dados das marcações imuno-histoquímicas, contendo número do cão, subgrupo, número de prontuário, tipo de neoplasia, número do bloco parafinado contendo o tumor, e resultado imuno-histoquímico de cada cão.

Cão/Subgrupo/Prontuário	Neoplasia	Bloco	Ki-67	CD -31	VEGF
C1/II/213806	ACGCA	54424	2,3	2,1	2
C2/III/237649	ACGCA	54579	0,01	6,86	2
C3/III/251836	ACGCA	54530	6,8	12,75	1
C7/I/250587	AGCA	54390	0,3	0,73	2
C8/III/247729	ACGCA	6431	8,6	2,34	3
C9/I/252128	AGCA	54582	2	10,81	2
C12/III/277446	ACGCA	6670	3,4	0	2
C13/I/248904	AGCA	7126		0,97	-
C14/I/248177	AGCA	6814	0,7	0,89	1
C15/I/225507	AGCA	53917		4,20	-
C16/I/249181	AGCA	7225	1,9		
C17/II/248268	ACGCA	6996	3,6	1,94	3
C18/I/247855	AGCA	6773	3,4	0,08	-
C21/I/246110	AGCA	55445	0,92	9,93	-
C23/I/247840	AGCA	6412	2,8	0	2
C24/IV/253914	ACASA	54897	9	5,08	1
C25/I/254804	AGCA	55055	8,8	6,29	2
C26/III/253212	ACGCA	54706	7,3	6,94	2
C27/III/241517	ACGCA	55073	6,8	1,86	1
C28/III/185720	ACGCA	54616	18,9	6,46	2
C29/II/251777	ACGCA	55253	14,1	5,81	2
C30/III/251838	ACGCA	54644	9	8,31	2
C31/II/251675	ACGCA	54769	10,7	1,86	2
C32/I/252600	AGCA	54666	9,8	5,57	3
C33/I/225271	AGCA	54632	1,5	4,52	1
C34/II/254030	ACGCA	55074	4,3	3,95	2
C35/II/254187	ACGCA	54961	4,9	5,97	2
C36/II/230338	ACGCA	54993	5,9	2,34	2
C38/I/253839	AGCA	54837	2,6	6,29	2
C39/II/253806	ACGCA	54765	9,5	5,08	3
C40/I/147796	AGCA	55114	3,9	5,89	3
C41/II/256174	ACGCA	55134	4,4	6,38	1

C42/II/255890	ACGCA	55140	3,5	8,72	2
C43/II/186862	ACGCA	55223	8	3,79	2
C44/II/242722	ACGCA	55300	7,1	3,87	1
C45/I/174233	AGCA	54948	2,8	4,52	2
C46/I/244105	AGCA	55306	4,26	9,28	2
C48/I/258551	AGCA	55484	3,9	3,47	2
C49/I/247674	AGCA	55481		4,68	2
C51/II/258472	ACGCA	55352		5,89	3
C54/I/260067	AGCA	55543	2,2	6,05	1
C55/I/259974	AGCA	55618	6	4,6	1
C57/I/258442	AGCA	55975	24	8,15	2
C58/I/260272	AGCA	55976	5,2	6,78	2
C59/I/138570	AGCA	56003	18,8	3,79	1
C60/I/252251	AGCA	55619	5,4	6,21	1
C62/I/258211	AGCA	55606	10,1	2,66	3
C63/I/262484	AGCA	55840	0	7,18	3
C64/II/263114	ACGCA	55906	2,2	3,15	1
C65/II/255186	ACGCA	55049	18,2	3,71	2
C66/I/264192	AGCA	56204	2,9	5,41	2
C67/II/264193	ACGCA	56155	11,8	4,76	3
C68/II/263705	ACGCA	56045	12,4	5,33	3
C69/III/263814	ACGCA	56133	19,9	4,2	2
C70/I/215268	AGCA	56310	7,7	2,26	2
C71/II/259348	ACGCA	56375	12,7	5	2
C72/II/265376	ACGCA	56490	1,51	6,86	3
C73/II/265808	ACGCA	56433	3,9	1,94	2
C74/I/181904	AGCA	56490	1,5	3,55	3
C75/III/265775	ACGCA	56499	3,9	6,21	3
C76/I/266327	AGCA	56491	2	4,68	2
C77/IV/266206	ACASA	56607	26,1	3,39	1
C79/I/267124	AGCA	56657	4,3	9,04	3
C80/II/258347	ACGCA	55400	56,2	3,87	2

Ki-67: número de núcleos positivos em 1000 células tumorais; **CD-31: microdensidade vascular, número de vasos/ μm^2 ($\times 10^{-4}$) marcados; VEGF: intensidade de marcação Fraca (1), Intermediária (2), Forte (3), ausente (-).

Espaços em branco: reação não realizada.

Para o grupo AGCA a média dos valores de Ki-67 foi de 4,91, sendo o menor valor zero e o maior 24. O grupo ACGCA teve média de 9,02, com maior e menor valor sendo, 0,01 e 45, respectivamente. O grupo ACASA, teve maior média 17,55, com mínima de 9 e máxima de 26. A contagem de CD-31 apresentou pouca variação entre os grupos, sendo mais elevado no AGCA. Bem como a contagem de VEGF que teve pequena variação, sendo maior em ACGCA. Os valores de média, mediana, máxima e mínima de cada marcador encontram-se na tabela 13.

Tabela 13 – Média, mediana, mínima e máxima de cada marcador imuno-histoquímico para os grupos AGCA, ACGCA e ACASA.

Variável	Casos	Média	Mediana	Mín.	Máx.
AGCA					
ki67	28	4,91	3,15	0	24
cd31	29	4,95	4,68	0	10,81
vegf	25	2,00	2,00	1	3
ACGCA					
ki67	30	9,02	6,95	0,01	45
cd31	31	4,78	4,76	0	12,75
vegf	31	2,10	2,00	1	3
ACASA					
ki67	2	17,55	17,55	9	26,1
cd31	2	4,24	4,24	3,39	5,08
vegf	2	1,00	1,00	1	1

Fonte: a autora

Figura 3 – Marcações imuno-histoquímicas para Ki-67, em aumento de 400x. (A) Grupo AGCA, Cão n°16, Ki-67: 1,9; (B) Grupo ACGCA, Cão n°29, Ki-67: 14,1; (C) Grupo ACASA, Cão n°77, Ki-67: 26,1.

ZANUTO, E. B. M.

Figura 4 – Marcações imuno-histoquímicas para VEGF, em aumento de 200x. (A) Grupo AGCA, Cão nº25, VEGF: 2; (B) Grupo ACGCA, Cão nº68, VEGF: 3.

Foi realizada correlação estatística entre os marcadores imuno-histoquímicos para avaliar se eram variáveis dependentes entre si, contudo não houve correlação, sendo dessa forma variáveis linearmente independentes, conforme observado na tabela 14.

Tabela 14 – Correlação entre Ki-67, CD-31 e VEGF.

	ki67	ki67	cd31	ki67
cd31	-0.071 [-0.187]			-0.039 [-0.095]
vegf		-0.530 [-0.346]	0.180 [0.364]	-0.525 [-0.339]
constante	7.824 [3.717]***	8.725 [2.698]**	4.553 [4.335]***	8.904 [2.365]*
Prob>F	0.852	0.761	0.717	0.9386
R2	0.006	0.002	0.002	0.002
N	59	57	59	57

* Nível de sig. de 0,1

** Nível de sig. de 0,05

*** Nível de sig. de 0,01

Fonte: a autora

Não foi observada correlação entre a presença de metástases regionais ou à distância e o aumento das taxas dos marcadores imuno-histoquímicos. Exceto, pelo CD-31, em que valores mais elevados apresentaram menor prevalência de metástases regionais, tabela 15 e 16.

Tabela 15 – Correlação entre Ki-67, CD-31 e VEGF e a presença de metástase regional no momento do diagnóstico.

Metástase Regional				
ki67	0.018 [0.913]		0.015 [0.729]	
cd31		-0.054 [-0.811]	-0.071 [-0.976]	
vegf			-0.299 [-1.063]	-0.289 [-0.992]
constante	-1.053 [-4.125]***	-0.682 [-1.886]	-0.305 [-0.529]	-0.100 [-0.138]
Prob>χ^2	0.377	0.416	0.283	0.488
N	60	63	59	57

*** Nível de sig. de 0,01

Fonte: a autora

Tabela 16 – Correlação entre Ki-67, CD-31 e VEGF e a presença de metástase à distância no momento do diagnóstico.

Metástase à Distância				
ki67	0.016 [0.688]		0.021 [0.876]	
cd31		-0.245 [-1.958]	-0.309 [-2.065]*	
vegf			-0.018 [-0.055]	0.010 [0.026]
constante	-1.518 [-4.849]***	-0.481 [-1.018]	-1.337 [-1.921]	-0.397 [-0.419]
Prob> χ^2	0.511	0.025	0.956	0.094
N	60	63	59	57

* Nível de sig. de 0,1

*** Nível de sig. de 0,01

Fonte: a autora

Não houve significância estatística quando comparado o aumento de Ki-67 e VEGF com a temperatura central do tumor (SpT) e nem com a temperatura da área tumoral (AT) em nenhum dos grupos avaliados, porém nos grupos ACGCA e ACASA, os tumores mais frios tiveram aumento significativo de CD-31, as tabela 17 e 18 ilustram os resultados da correlação.

Tabela 17 – Correlação entre Ki-67, CD-31 e VEGF e a temperatura no ponto central do tumor.

	SPT							
	Adenoma				Carcinoma			
ki67	-0.147 [-1.501]			-0.153 [-1.323]	-0.039 [-0.379]			0.001 [0.007]
cd31		-0.069 [-0.354]		0.033 [0.125]		-0.331 [-2.228]*		-0.365 [-2.402]*
vegf			-1.206 [-1.319]	-1.180 [-1.256]			-0.645 [-0.931]	-0.894 [-1.394]
Constante	36.257 [46.317]***	35.689 [34.991]***	37.657 [19.976]***	38.498 [17.322]***	35.449 [40.566]***	36.894 [41.904]***	36.492 [24.439]***	38.901 [22.541]***
N	22	24	20	19	20	20	20	20
Prob > F	0.726	0.204	0.204	0.361	0.709	0.038	0.364	0.115
R2	0.005	0.037	0.088	0.186	0.007	0.216	0.045	0.302

* Nível de sig. de 0,1

*** Nível de sig. de 0,01

Fonte: a autora

Tabela 18 – Correlação entre Ki-67, CD-31 e VEGF e a temperatura na área tumoral.

	MediaAt							
	Adenoma				Carcinoma			
ki67	-0.134 [-1.557]			-0.151 [-1.466]	-0.159 [-2.068]			-0.130 [-1.858]
cd31		-0.028 [-0.162]		0.092 [0.396]		-0.273 [-2.177]*		-0.273 [-2.345]*
vegf			-0.711 [-0.858]	-0.699 [-0.833]			-0.553 [-0.952]	-0.644 [-1.313]
Constante	36.491 [53.151]***	35.811 [39.820]***	37.022 [21.676]***	37.617 [18.951]***	36.097 [54.525]***	36.366 [48.964]***	36.078 [28.813]***	38.628 [29.278]***
N	22	24	20	19	20	20	20	20
Prob > F	0.135	0.872	0.402	0.441	0.053	0.043	0.354	0.029
R2	0.108	0.001	0.039	0.159	0.147	0.208	0.048	0.421

* Nível de sig. de 0,1

*** Nível de sig. de 0,01

Fonte: a autora

Ao se comparar a área tumoral com os marcadores imuno-histoquímicos foi constatado que o aumento de Ki-67, VEGF e CD-31 é significativamente maior nos tumores com maior área, de acordo com a tabela 19.

Tabela 19 – Correlação entre Ki-67, CD-31 e VEGF e a área tumoral.

	Log Area Tumoral							
	Adenoma				Carcinoma			
ki67	0.783			0.049	0.899			0.179
	[4.329]***			[0.358]	[6.721]***			[1.198]
cd31		1.449		0.431		1.304		0.292
		[7.533]***		[1.485]		[6.751]***		[1.363]
vegf			4.063	3.018			3.985	2.750
			[10.961]***	[4.316]***			[11.408]***	[4.216]***
N	22	24	20	19	20	20	20	20
Prob > F	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
R2	0.471	0.711	0.863	0.882	0.704	0.872	0.872	0.900

* Nível de sig. de 0,1

*** Nível de sig. de 0,01

Fonte: a autora

A correlação estatística entre os resultados da tomografia foi realizada somente com o grupo ACGCA, pois o baixo número de amostras dos demais grupos não permitiu uma regressão. Notou-se que os tumores com ki-67 maior tendem a ser mais vascularizados, porém o resultado não foi estatisticamente significativo. Em relação aos demais marcadores não houve diferença (tabela 20). Bem como, não houve correlação entre os demais parâmetros analisados pela tomografia, como comprometimento ósseo e pontos de clivagem com os marcadores analisados, em consoante à tabela 21.

Tabela 20 – Correlação entre Ki-67, CD-31 e VEGF e atenuação e vascularização tumoral no exame tomográfico, apenas para os tumores ACGCA.

	ACGCA					
	atenuação			vascularização		
ki67	0.093			0.132		
	[1.204]			[1.959]		
cd31		-0.025			0.061	
		[-0.350]			[0.883]	
vegf			0.000			-0.250
			[0.000]			[-1.095]
Constante	0.268	0.837	0.750	0.067	0.541	1.250
	[0.622]	[2.752]*	[1.414]	[0.179]	[1.873]	[2.582]*
Prob>F	0.273	0.738	1.000	0.098	0.411	0.325
R2	0.194	0.020	0.000	0.390	0.114	0.166
N	8	8	8	8	8	8

* Nível de sig. de 0,1

Fonte: a autora

ZANUTO, E. B. M.

Tabela 21 – Tabela de correlações entre Ki-67, CD-31 e VEGF com os principais parâmetros avaliados na tomografia: comprometimento ósseo, clivagem com glúteo, cauda, reto, musculatura e uretra, para os tumores ACGCA.

	ACGCA		
	ki67	cd31	vegf
Comprom. ósseo	0.2364 0.5729	-0.5417 0.1655	0.4082 0.3153
Clivagem glúteo	-0.2364 0.5729	0.5417 0.1655	-0.4082 0.3153
Clivagem cauda	-0.1152 0.7859	0.1711 0.6855	0.0000 1.000
Clivagem reto	-0.2384 0.5697	-0.3041 0.4639	0.0000 1.000
Cliv. musculatura	-0.4182 0.3025	0.6532 0.0791	0.0000 1.000
Clivagem uretra	-0.2793 0.5029	0.4292 0.2886	0.0000 1.000
Comprom. Ósseo – Comprometimento ósseo			
Cliv. Musculatura – Clivagem musculatura			
n=8			
p-valores abaixo dos coeficientes			
Fonte: a autora			

Não houve correlação estatística entre o aumento dos marcadores tumorais com o tempo de sobrevida em nenhum grupo analisado. Como visto nas tabelas 22 e 23.

Tabela 22 - Correlação entre Ki-67, CD-31 e VEGF e o tempo de sobrevida dos animais com ACGCA que não fizeram quimioterapia.

Tempo de Sobrevida (dias)				
ki67	-8.295 [-0.683]		-8.468 [-0.891]	
cd31		74.579 [3.347]**		70.956 [3.324]**
vegf			-149.361 [-1.237]	-131.267 [-1.345]
constante	704.860 [5.266]***	288.390 [2.373]*	923.455 [3.720]**	637.271 [2.463]*
sigma	371.454 [6.399]***	301.531 [6.390]***	361.274 [6.394]***	287.090 [6.393]***

N	22	22	22	22
* Nível de sig. de 0,1				
** Nível de sig. de 0,05				
*** Nível de sig. de 0,01				
Fonte: a autora				

Tabela 23 - Correlação entre Ki-67, CD-31 e VEGF e o tempo de sobrevida dos animais com ACGCA que fizeram quimioterapia e que os não fizeram.

	Sobrevida em dias							
	quimio				sem quimio			
ki67	16.938			12.216	-41.763			-28.582
	[1.033]			[1.044]	[-1.659]			[-1.644]
cd31		62.633		67.238		106.703		111.511
		[3.013]*		[2.952]*		[1.999]		[2.695]*
vegf			-60.383	102.483			-211.824	-275.290
			[-0.304]	[0.628]			[-1.184]	[-2.231]
constante	578.758	399.498	837.710	73.454	867.349	99.689	993.051	879.123
	[3.368]**	[2.990]*	[2.116]	[0.185]	[3.904]**	[0.397]	[2.525]*	[2.673]*
sigma	312.831	234.934	326.177	219.764	386.095	358.188	396.403	267.786
cons	[4.177]**	[4.219]**	[4.139]**	[4.222]**	[4.407]**	[4.361]**	[4.358]**	[4.368]**
Prob > χ^2	0.314	0.012	0.763	0.040	0.101	0.066	0.253	0.022
N	10	10	10	10	11	11	11	11

Quimio – quimioterapia

Fonte: a autora

5.8 AVALIAÇÃO DA TERAPIA

Os pacientes do grupo AGCA não realizaram o tratamento adjuvante, pois possuíam tumores benignos. Ao fim do projeto, conseguiu-se contato com os tutores de 23 animais que participaram, sendo que dez destes animais vieram à óbito durante o período por motivos não relacionados ao tumor, e não houve recidiva tumoral em nenhum paciente.

No grupo ACGCA, 10 animais receberam a quimioterapia metronômica, sendo eles o subgrupo II. E do grupo ACASA (subgrupo IV), três receberam o tratamento.

Do grupo ACGCA, 24 animais não receberam terapia quimioterápica devido, principalmente, à desistência dos tutores ou ausência de condições clínicas e laboratoriais para a realização da quimioterapia. Eles foram classificados como subgrupo III, para esses animais foi aplicado aos tutores, por contato telefônico, um questionário a respeito de recidiva tumoral e tempo de sobrevida. Doze responsáveis responderam e partir disso, foi possível elaborar a ZANUTO, E. B. M.

curva de sobrevida – Kaplan Meier desses cães e compará-la ao grupo que recebeu o tratamento quimioterápico. Nesses pacientes não houve indícios de recidiva e nenhum paciente veio a óbito devido a complicações da doença, segundo os relatos.

Os cães C8, C12 e C77 receberam quimioterapia por mais tempo do que o prazo de 6 meses devido as evidências de metástase à distância. C8 fez uso durante 12 meses, C12 e C77, durante 8 e 9 meses respectivamente. Os responsáveis por C8 e C12 pararam a quimioterapia por conta própria e o paciente C77 tomou até o óbito.

Dos pacientes do grupo II que iniciaram a quimioterapia, oito concluíram o prazo de seis meses. Durante o tratamento C2 teve um acidente vascular encefálico (AVE) diagnosticado por RM logo após o término da quimioterapia, e apresentou recidiva tumoral 12 meses após a cirurgia, vindo a óbito em 15 meses devido a um linfoma multicêntrico. Outro paciente, teve manifestações clínicas semelhantes a um AVE, mas não obteve diagnóstico de imagem, não sendo possível a confirmação. As respectivas curvas de sobrevida de Kaplan Meier se encontram a seguir.

Gráfico 7 - Curva de sobrevida Kaplan – Meier do subgrupo II e III.

Fonte: a autora

A média de sobrevida do subgrupo II foi de 740,95 dias, com um tempo mínimo de 491,73 dias e máximo de 1389,02 dias, enquanto, a média de sobrevida do subgrupo III foi de 546,21 dias, com mínimo de 15 dias e máximo de 1172,06 dias. Até a data de fechamento do projeto, em dezembro de 2019, três de 10 pacientes do subgrupo II estavam vivos, enquanto ZANUTO, E. B. M.

que no subgrupo III, 7 de 12 estavam vivos. Não houve diferença estatisticamente significativa no tempo de sobrevida de ambos os subgrupos, conforme teste de Kaplan Meyer ($p=0,781$) (JUUL, 2008).

Dos cinco cães do grupo ACASA, C19 foi eutanasiado três dias após a cirurgia e C24 dois meses após a cirurgia, porém esse paciente possuía, além do tumor ACASA, apresentava um melanoma cutâneo e um GIST abdominal; não sendo possível determinar a causa do óbito neste animal. Três animais iniciaram o protocolo quimioterápico. C6 não apresentou efeitos adversos, e completou o tratamento. C10 foi eutanasiado 25 dias após o início da terapia, devido a complicações da doença. Nos exames de imagem controle, o paciente apresentou alterações em vários linfonodos abdominais, fígado e baço, além de piora das metástases ósseas. C6 e C77 completaram o tratamento quimioterápico conforme prescrito.

A média de sobrevida do subgrupo IV foi de 534,99 dias, com um tempo mínimo de 31,43 e o máximo de 1172,06 dias. Todos os pacientes vieram a óbito. O gráfico 8 representa a curva de sobrevida Kaplan – Meier do subgrupo IV.

Gráfico 8 - Curva de sobrevida Kaplan – Meier do subgrupo IV.

Fonte: a autora

5.9 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE QUIMIOTERÁPICA

A toxicidade quimioterápica foi avaliada durante o período de tratamento de cada animal, os cães que não completaram os 6 meses de tratamento tiveram a avaliação interrompida a partir do momento que pararam de tomar a medicação. A análise foi dividida em laboratorial e gastrointestinal.

Em ambos os subgrupos, houve pouca toxicidade laboratorial, sendo que a maioria dos resultados ficou entre graus 1 e 2 de acordo com os parâmetros da VCOG, somente no parâmetro plaquetas em C10 teve classificação 3 no tempo t2 em todos os períodos e parâmetros analisados. Apenas C28 desenvolveu toxicidade graus 1 e 2 no parâmetro Toxicidade hepática. E três animais apresentaram toxicidade grau 1 no parâmetro Toxicidade renal, sendo dois do subgrupo II e um do subgrupo IV. A tabela 24 resume os resultados destes três parâmetros.

Nenhum dos pacientes do subgrupo II apresentou alterações gastrointestinais durante o tratamento quimioterápico. Apenas C10 do subgrupo IV apresentou toxicidade grau 2 gastrointestinal, com manifestações clínicas de hiporexia e êmese após 15 dias da terapia, o tratamento foi suspenso e iniciado suporte. O paciente já havia histórico de gastrite medicamentosa recorrente, e por esse motivo raramente ingeria medicação via oral. O animal veio a óbito 25 dias após o início da terapia, devido, a complicações da doença.

A tabela 25 resume a incidência dos efeitos clínicos adversos com seus respectivos graus observados nos subgrupos II e IV durante todo o tratamento quimioterápico.

Tabela 24 – Grau de toxicidade nos subgrupos II e IV, durante o período de tratamento referente às variáveis: plaquetas, ALT e creatinina.

Nome	Sub Grupo	Plaquetas						ALT						Creatinina					
		Grau de Toxicidade						Grau de Toxicidade						Grau de Toxicidade					
		t1	t2	t3	t4	t5	t6	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t1	t2	t3	t4	t5	t6
C2	II	0	0	0				0	0	0				0	0	0			
C3	II	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
C8	II	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	
C12	II	0	0	0				0	0	0				0	0	0			
C26	II	0	0	0				0	0	0				0	0	0			
C27	II	1	0	0	0	1		0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	
C28	II	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
C30	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
C69	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C73	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C69	IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C10	IV	0	3					0	0					0	0				
C77	IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

t1 - 1º mês, t2 – 2º mês, t3 – 3º mês, t4 – 4º mês, t5 – 5º mês, t6 – 6º mês

Fonte: a autora

Tabela 25 - Incidência dos efeitos adversos à administração dos quimioterápicos nos subgrupos II e III durante todo tratamento quimioterápico de acordo com os critérios de avaliação da toxicidade adaptada para cães (Veterinary Cooperative Oncology Group- VCOG-CTCA-2011).

	Grau 1		Grau 2		Grau 3		Grau 4	
	Grupo II	Grupo IV	Grupo II	Grupo IV	Grupo II	Grupo IV	Grupo II	Grupo IV
Anorexia/Hiporexia	---	---	---	1	---	---	---	---
Êmese	---	---	---	1	---	---	---	---
Diarreia	---	---	---	---	---	---	---	---
Cistite	---	---	---	---	---	---	---	---
Letargia	---	---	---	---	---	---	---	---

Fonte: a autora

6. DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este estudo teve por objetivo analisar os tumores perianais e tumores apócrinos de saco anal sob diferentes aspectos, como a questão clínico cirúrgica, citológica, histopatológica, termográfica, imuno-histoquímica e terapêutica, visando um melhor entendimento dessas neoplasias na tentativa de proporcionar dados que contribuam para uma melhor abordagem diagnóstica e terapêutica na rotina clínica. Os resultados e limitações serão discutidos a seguir.

Com base nos dados obtidos, verifica-se que nossos resultados são semelhantes aos descritos em literatura no quesito epidemiológico. Os adenomas de glândulas circum-anaís foram os mais prevalentes representando 52,5% dos tumores incluídos, seguidos pelos adenocarcinomas de glândula circum-anal com 41,25% e os adenocarcinomas apócrinos de saco anal com 6,25%, não houve casuística de epitelíomas perianais. De maneira geral, em literatura, os adenomas circum-anaís foram mais prevalentes, contudo, existe uma elevada variância entre eles, já que os adenomas podem representar de 46 a 96% dos casos. Ganguly, Wolfe (2006) avaliam a hipótese de que áreas focais de pleomorfismo celular podem sugerir malignidade e levar a diferentes interpretações. Wasques (2018) concluiu em sua pesquisa que existe um grau de concordância razoável entre patologistas no diagnóstico das neoplasias perianais, porém há possibilidade de melhorar com aplicação de novos algoritmos diagnósticos. A variância mesmo não se aplica aos adenocarcinomas apócrinos de saco anal, pois não há relatos de discordância de diagnóstico entre os patologistas nessa região e também outros tumores na região são mais raros (NIELSEN, ATTOSMIS, 1964; VAN DEN INGH, 1989; ROSS et al., 1991, ASSUNÇÃO, 2003; SOUZA et al., 2006; KIMURA, GÁRATE, DAGLI, 2012, ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, 2013; VICENTE, PERALES, TABACCHI, 2015; TOSTES et al., 2017). Não foi possível realizar um estudo de incidência desses tumores, devido à ausência de dados gerais coletados pelo hospital.

A prevalência dos adenocarcinomas apócrinos do saco anal se mostrou menor neste estudo do que a média citada em literatura de aproximadamente 17% (BERROCAL, 1989), sendo atendidos apenas 5 casos durante o período de pesquisa.

A média de idade dos cães com tumores perianais foi em torno de 11,43 anos, resultado semelhante ao descrito em literatura (WILSON, HAYES, 1979; GOLDSCHMIDT; ZOLTOWSKI, 1981; BENNETT, et al., 2002; ARONSON, 2003; WILLIAMS et al., 2003). E para o grupo ACASA foi de 12,4 anos, valor ligeiramente maior à média relatada de 9 a 11 anos. Anderson et al (2013) relataram a média de sete anos de idade e o nosso trabalho obteve ZANUTO, E. B. M.

a maior média dentre os estudos pesquisados (GOLDSCHMIDT; ZOLTOWSKI, 1981; BENNETT, et al., 2002; WILLIAMS et al., 2003; ANDERSON, et al., 2013; BARNES; DEMETRIOU, 2017; SKORUPSKI, et al., 2018; ELLIOT, 2019).

Os machos foram mais acometidos representando 83,75% do total de pacientes, corroborando os dados presentes em prévios de que os tumores perianais apresentam predisposição sexual (WILSON, HAYES, 1979). Os machos não castrados tiveram uma incidência maior nos grupos AGCA e ACGCA, 76,47 e 75%, respectivamente. Os dados fomentam o estudo de Pisani et al. (2006), que relata a influência de hormônios androgênicos não somente em adenomas de glândulas circum-anal, mas adenocarcinomas circum-anais também, pois ambos possuem receptores androgênicos em sua superfície, porém em menor número nos tumores malignos. A proporção de machos inteiros foi por volta de 25%, maior do que descrito anteriormente pela literatura (WILSON, HAYES, 1979), mas condizente com o estudo de Wasques (2018), que encontrou 29% de machos não castrados. Todas as fêmeas do estudo eram castradas, uma vez que na ausência da influência hormonal ovariana, pode ocorrer aumento de hormônios androgênicos (WILSON, HAYES, 1979; DOW et al., 1988; HILL, 2005).

Os animais sem raça definida foram os mais acometidos nos três grupos, representando 38,09%, 42,42% e 60%, respectivamente, resultado compatível com outros estudos de casuística nacional (ASSUNÇÃO, 2003; WASQUES, 2018). Os cães da raça Poodle foram mais acometidos, correspondendo a 16,66% no grupo AGCA e 15,15% no grupo ACGCA. Seguidos pelos pacientes das raças: Dachshund, Yorkshire, Labrador, Shih Tzu, Lhasa Apso. Esses resultados são semelhantes a outros estudos nacionais (MEIRELLES et al., 2010), porém não é possível determinar uma predisposição genética dessas raças para tumores perianais. Observa-se em diferentes trabalhos que cães da raça poodle estão entre os mais predispostos a ter neoplasias cutâneas, dentre elas os tumores perianais, mas não os tumores do saco anal (FERNANDES et al., 2015; VICENTE et al., 2015; TOSTES et al., 2017). Não se observou maior ocorrência de adenocarcinomas circum-anais em cães porte grande conforme observado por Vail et al. (1990) e Assunção (2003). Em um estudo britânico, Polton et al. (2006) referiram maior incidência de adenocarcinomas de saco anal nas raças Cocker Spaniel Inglês, Springer Spaniel Inglês e Cavalier Kings Charles, dados que também não correspondem ao presente estudo.

Tais discrepâncias entre estudos podem ser atribuídas por razões geográficas e/ou temporais, visto que muitas raças citadas em estudos internacionais não são frequentes no

Brasil, bem como, existe alternância de preferência de raças pelos tutores ao longo dos anos (DOBSON, 2013; GHIRLANDA et al., 2013).

Nódulos únicos foram mais frequentes nos três grupos estudados, nódulos múltiplos apareceram ligeiramente mais no grupo AGCA, seguidos do grupo ACGCA. Porém, em relação à ulceração, o grupo ACGCA possuía mais que o dobro em relação aos animais do grupo AGCA. Outro dado clínico que podemos destacar é a maior velocidade de crescimento tumoral dos ACGCA em relação aos AGCA, bem como, a presença de tenesmo presente nos tumores malignos, mas ausente nos adenomas. Tais elementos corroboram com a literatura prévia (TUREK, WITHROW, 2013), podendo auxiliar no diagnóstico da doença junto aos exames complementares.

Um dos cães ACASA possuía acometimento bilateral do saco anal, condição mais rara, porém já descrito em literatura por Turek, Withrow (2013) e Emms (2005). Nenhum dos pacientes com adenocarcinoma do saco anal apresentou recidiva ou teve acometimento da glândula contralateral como relatado por Bowlt et al. (2013).

O estadiamento clínico foi realizado de acordo com diretrizes da *World Health Organization (WHO)* (OWEN et al., 1980) para todos os grupos e para ACASA foi realizado também o Estadiamento clínico segundo Polton; Brearley (2007). Para tal, utilizou-se exames de imagem como ultrassonografia abdominal, radiografia torácica e tomografia computadorizada abdominal para o estadiamento, no entanto, não foi possível realizar neste estudo a citologia guiada por ultrassom de linfonodos e órgãos abdominais a título de comprovação das alterações encontradas nos exames imagem, por isso, sugere-se para estudos futuros que tal exame seja incluído em avaliações. Para considerar as correlações de exames de imagem com estadiamento clínico nos baseamos em trabalhos prévios humanos e animais que relacionam alterações estruturais nos exames de imagem ao exame histopatológico posterior (ANDERSON, et al., 2013; YU, et al., 2018; MARINO et al., 2020).

A limitação dessa forma de avaliação consiste na incerteza de que um aumento e/ou heterogeneidade de um linfonodo possa significar de fato uma metástase ou apenas uma reação ao processo inflamatório que é observado junto às neoplasias, falsos negativos também podem ocorrer (AMANO et al., 2020; KHAN; MASROOR; KHANDWALA, 2020). O estadiamento clínico do grupo AGCA foi realizado somente em relação ao tamanho tumoral (T), por se tratar de uma neoplasia benigna e não ocasiona metástases, sendo que a maioria das formações eram estágio T1 e T2, não tivemos T4, presumimos que seja devido ao crescimento mais lento dos

adenomas, podendo demorar muitos meses para alcançar um estadiamento T3 ou T4 (TUREK, WITHROW, 2013).

Enquanto, no grupo ACGCA a maioria dos pacientes já tinham tumores maiores, entre 3 e 5 cm, e estadiamento T2N0M0. Em nenhum tumor com estadiamento T1 havia presença de metástase, mas no estágio T4, todos já demonstravam metástase regional ou à distância nos exames complementares. Os estudos sugerem que os adenocarcinomas circum-anais possuem baixa taxa metastática no momento do diagnóstico, em nosso estudo obtivemos a taxa de 27,27% de metástase, valor maior que o da literatura que cita variações de 8 a 20% (TUREK, WITHROW, 2013). O valor encontrado pode ter sido superdimensionado, pois como descrito anteriormente a avaliação não foi histopatológica, e linfonodos reacionais podem mimetizar um linfonodo neoplásico. Os pacientes que fizeram quimioterapia tiveram acompanhamento ultrassonográfico abdominal trimestral, e nestes animais, os que dispunham de linfonodos alterados no momento do diagnóstico, mantiveram as alterações durante todo acompanhamento, mesmo após o procedimento cirúrgico e resolução da inflamação, sugerindo um possível quadro metastático e não reacional. Os ACGCA mesmo sendo tumores bem diferenciados, que possuem pouco pleomorfismo e baixo número de mitoses podem metastatizar, como descrito por Tunc et al. (2014) e McCourt et al. (2018). Wasques (2018), observou que os tumores vasculoinvasivos/metastáticos possuíam um tamanho tumoral maior e um provável comportamento biológico mais agressivo.

O mesmo não ocorre com os tumores ACASA, visto que 40% deles já demonstravam evidências de metástases à distância mesmo com tamanho tumoral T1 e T2, indicando maior capacidade metastática que os ACGCA. No momento do diagnóstico, 60% dos cães já apresentavam indícios de metástase, conforme relatado em estudos prévios que referem um intervalo amplo de 36 a 96% (BROWN et al., 2012; PRADEL et al.; 2018) e 21 a 79% (ROSS et al., 1991; POTANAS, PADGETT, GAMBLIN, 2015). Os outros 40% embora tivessem tamanho T4, não possuíam indícios de metástase no momento do diagnóstico, por isso suspeita-se que exista uma variabilidade do comportamento tumoral, pois alguns pacientes apresentam tumores primários extensos, porém sem doença metastática evidente. Tal fato pode ser justificado pela grande variabilidade das taxas metastáticas relatadas nos estudos prévios. A classificação de estadiamento clínico proposto por Polton; Brearley (2007) se mostrou importante para definição de melhor tratamento e prognóstico, visto que o paciente C6 (estágio 2) teve melhor resposta e maior taxa de sobrevida que os C10, C24 e C77, todos estágios 4.

Em todos os casos do estudo, tentou-se obter a maior margem cirúrgica possível visando margens livres de células neoplásicas, porém tentando manter o funcionamento normal do esfíncter anal externo, evitando desta forma a incontinência fecal sempre que possível.

No grupo AGCA a taxa de complicação cirúrgica foi menor que a dos outros grupos, sendo a deiscência a mais frequente, tal fato pode estar relacionado ao menor tamanho dos tumores, bem como a ausência de necessidade de margens amplas pelo fato do tumor ser benigno (TUREK, WITHROW, 2013). Em dois cães tivemos que fazer a excisão total do esfíncter anal externo devido ao comprometimento geral da estrutura e intenso sangramento. No cão C38 optamos por retirar parte da formação e castrar o paciente, dessa forma houve redução total das formações em 180 dias, validando os dados em literatura, e confirmamos a orientação que para tumores generalizados ou muito grandes, a orquiectomia prévia é de grande ajuda (WILSON; HAYES, 1979; ASSUNÇÃO, 2003).

Em cinco animais do grupo ACGCA foram obtidas margens comprometidas, em apenas um deles, houve recidiva tumoral no período de acompanhamento do estudo. Os ACGCA possuem como característica a capacidade de ser localmente invasivos, e por isso, são conhecidos também pelo caráter recidivante (TUREK, WITHROW, 2013).

Em relação aos adenocarcinomas apócrinos de saco anal, C10 apresentou margens cirúrgicas comprometidas tanto laterais como profundas mesmo com ressecção ampla. Visto que o tumor media cerca de 1,5cm, nota-se o intenso grau de invasão tumoral em tecidos adjacentes como reto e musculatura pélvica, esse paciente já possuía metástase regional e à distância no momento do diagnóstico. Ao passo que nos outros quatro cães do grupo ACASA obteve-se margens cirúrgicas livres mesmo com tumores maiores. Tais dados corroboram com a descrição em literatura em relação ao grau de invasão tumoral, mas também sustentam que existe uma variabilidade no comportamento tumoral que independe de tamanho (BENNETT et al., 2002; WILLIAMS et al., 2003; TUREK, WITHROW, 2013).

A complicação cirúrgica mais frequente foi a deiscência da ferida cirúrgica, que está diretamente ligada ao volume tumoral, e segundo relato dos responsáveis pelos animais, a dificuldade em realização de limpeza devido à localização da lesão também pode ter colaborado para a contaminação da ferida, a infecção foi a complicação mais frequente relatada por Williams et al. (2003). Entretanto, alguns pacientes não usaram o colar elisabetano conforme solicitado havendo desta forma autotraumatismo. De acordo com a literatura (FOSSUM, 2015), as complicações cirúrgicas estão relacionadas ao volume tumoral, grau de comprometimento de estruturas adjacentes e localização da ferida cirúrgica, o mesmo foi observado neste trabalho.

A incontinência fecal intermitente ou permanente ocorreu em sete cães em decorrência da excisão completa do esfíncter anal externo, que foi realizada devido a extensão das neoplasias. Os dois animais que apresentaram estenose da ampola retal após a remoção completa dos esfíncteres anais externos tiveram intensa fibrose em torno do reto, sendo necessária uma nova cirurgia para remoção e aplicação da técnica de Zplastia bilateral em região de períneo. As causas da fibrose somente nesses dois pacientes são desconhecidas e acredita-se que ser variação individual. A técnica de Zplastia pode ser utilizada para diminuir a tensão local, por redirecionar o retalho de pele impedindo dessa forma a retração cicatricial, ela é indicada em região de orifícios. O presente estudo utilizou esta técnica com o intuito de impedir a estenose pela retração cicatricial (TOBIAS, 2010). Após o procedimento não houve recidiva da estenose em ambos os casos.

O exame citológico se mostrou um bom método diagnóstico apresentando 81,5% de correlação com histopatológico, resultado semelhante ao descrito por Yumuşak, Çalışkan, Kutsal (2016) de 84,37% e ligeiramente menor que por Assunção (2003) com 90%. E em contraposição a Stannard, Pulley (1978) e outros autores que relatam dificuldades em diferenciar adenomas de adenocarcinomas bem diferenciados, Simeonov (2019) descreveu uma técnica morfométrica para diferenciação dos dois tipos tumorais com boa correlação histológica.

Porém a citologia não conseguiu diferenciar adenocarcinoma circum-anal de adenocarcinoma apócrino de saco anal, contudo, devido a suas diferenças anatômicas e manifestações clínicas distintas, não se pode considerar que o diagnóstico tenha sido prejudicado pela ausência de diferenciação. A citologia também foi importante para diferenciação de outros tipos tumorais, assim como descrito por Stannard, Pulley (1978). No presente estudo não foi atendido nenhum paciente com adenoma apócrino de saco anal, sendo estes considerados bastantes raros em cães (BENNETT et al., 2002; WILLIANS et al., 2003). Simeonov, Simeonova (2008) relatam sete casos de adenomas apócrinos de saco anal em seu estudo citológico comparativo com adenocarcinomas, o método utilizado consistiu na análise citomorfométrica quantitativa nuclear a partir de amostras citológicas de tumores do saco anal para diferenciação dos dois tumores, a técnica se mostrou promissora, apesar do número pequeno de amostras.

Dentre os animais com tumores testiculares, o leydigoma foi o mais frequente nos três grupos, seguido pelo sertolinoma e seminoma. O resultado foi condizente com literatura, já que os tumores intersticiais são os mais comumente associados aos tumores perianais, pois as

células de Leydig produzem hormônios androgênicos que contribuem para o desenvolvimento tumoral (WILSON, HAYES, 1979; PISANI et al. 2006). Apesar da maior frequência dos leydigomas não houve correlação estatística com o tipo tumoral no presente estudo.

Não ocorreu hipercalcemia em nenhum paciente do grupo ACGCA, conforme descrito por Assunção (2003). Também não se observou aumento de cálcio iônico em nenhum animal com ACASA, oposto do que é preconizado em literatura (GRONE et al., 1994; WILLIAMS et al., 2003; MESSINGER et al., 2010; BERGMAN, 2012). Nem os pacientes com estadiamento mais avançado apresentaram a alteração. São necessários mais estudos com um maior número de animais para uma melhor avaliação.

Em relação às alterações radiográficas, apenas um cão do grupo ACGCA apresentou nodulações pulmonares, sendo estas de características únicas e nodulares. As metástases pulmonares não costumam ser frequentes nos tumores ACGCA e ACASA, as formações abdominais costumam ser mais descritas (HOELZLER et al., 2001).

No exame ultrassonográfico as alterações em testículos foram as mais prevalentes nos grupos ACGA e ACGCA, sendo 15 e 16 cães acometidos, respectivamente. Alguns desses animais possuíam degeneração testicular e não necessariamente tumores testiculares, a diferenciação apenas foi possível com o resultado do histopatológico. No grupo AGCA os nódulos hepáticos e esplênicos, assim como o aumento de linfonodos ilíacos não foram considerados metastáticos, devido a benignidade dos adenomas. O aumento e heterogeneidade de linfonodos ilíacos dos grupos ACGCA e ACASA foram as segundas alterações mais observadas, dado semelhante a literatura que refere o acometimento de linfonodos ilíacos, tanto por inflamação como por metástases, nos carcinomas circum-anaís e apócrinos de saco anal (ANDERSON et al., 2013; PALLADINO et., 2016; MAJESKI et al., 2017). A terceira alteração mais comum encontrada em ambos os grupos foi nodulações esplênicas, seguidas por nódulos hepáticos. Essas alterações são inespecíficas, de tal modo que não é possível afirmar se tratar de metástases provocadas pela doença, porém condizem com a literatura (HOELZLER et al., 2001; LABRES-DIAZ et al., 2004; MAYER, 2010).

A ultrassonografia não foi capaz de detectar alterações em nenhum linfonodo sacral, ao passo que, a TC observou alterações em quatro animais, sendo quatro do grupo ACGCA e um do grupo ACASA. Na tomografia computadorizada todos os animais que possuíam alterações em linfonodos ilíacos também apresentaram em linfonodos sacrais, exceto C12. O resultado sugere que os linfonodos sacrais por se apresentarem mais próximos das glândulas, tendem a ser os primeiros sítios de metástase, seguido pelo linfonodos ilíacos, de acordo com o relatado

por Anderson et al. (2013) e Majeski et al. (2017). Porém, como esses tumores se apresentam geralmente junto a intensa inflamação, esses linfonodos podem ser apenas reativos e não metastáticos, conforme discutido previamente (AMANO et al., 2020; KHAN; MASROOR; KHANDWALA, 2020) sendo necessários estudos histopatológicos para confirmação de metástase. Wouda et al. (2013) referiram em seu estudo que todos os linfonodos alterados no exame tomográfico, após confirmação por histopatológico eram metastáticos. Os linfonodos aórticos lombares não demonstraram a mesma sequência de acometimento como os sacrais e ilíacos, se mostrando aumentados em apenas um animal do grupo ACASA, enquanto que na ultrassonografia abdominal nenhum paciente apresentou alteração nessas estruturas, sugerindo desta forma que esses linfonodos não participam tão diretamente da drenagem perianal como os linfonodos sacrais e ilíacos (WILLIANS et al., 2003).

Anderson et al. (2013) compararam a ressonância magnética (RM) com a ultrassonografia abdominal na capacidade de detecção de alterações metastáticas em linfonodos. Através desses resultados, os autores relatam que a ultrassonografia abdominal teve uma falha de 67% na detecção de linfadenomegalia quando comparados a RM. No presente estudo a TC mostrou-se eficiente para detecção de alterações em linfonodos intrapélvicos e abdominais, assim como, a ressonância magnética, com a vantagem de ser mais acessível, apresentar um custo menos elevado e menor tempo anestésico quando comparado à RM.

Em relação à avaliação tomográfica da região perianal o grupo AGCA, assim como, descrito em literatura apresentou em sua maioria tumores pouco vascularizados e encapsulados, evidenciando pouco comprometimento das estruturas adjacentes ao tumor (BERROCAL, VOS, 1989). No grupo ACGCA e a ACASA, o grau de vascularização tumoral esteve mais relacionado ao tamanho tumoral, e não ao tempo de evolução da neoplasia. O mesmo não foi observado com o grau de heterogeneidade, sendo que a maioria dos tumores se mostrou heterogêneos, independente do tamanho. Nenhum dos tumores apresentou invasão óssea, evidenciando dessa forma o baixo grau de acometimento ósseo desses tumores quando comparados a outros tipos tumorais, como o melanoma, por exemplo (RAMOS-VARA et al., 2000). Porém, assim como descrito por Vail et al. (1990) observou-se intensa invasão de tecidos moles adjacentes, principalmente do reto e musculatura intrapélvica, sendo dependentes também do volume tumoral. Contudo, o volume tumoral não foi determinante para o aparecimento de alterações em linfonodos regionais na TC, tumores menores também apresentaram aumento e heterogeneidade nestes linfonodos.

A tomografia mostrou-se mais eficiente que a ultrassonografia abdominal na detecção de alterações tanto em linfonodos sacrais como em ilíacos. Os linfonodos sacrais foram os mais acometidos seguidos pelos ilíacos. O exame tomográfico se mostrou importante para o estadiamento tumoral, porém deve ser analisado em conjunto com a biópsia ou citologia dos linfonodos. Com a TC também foi possível localizar alterações adjacentes à neoplasia e realizar um melhor planejamento cirúrgico dos pacientes (DE SWARTE et al., 2011; ANDERSON et al., 2013).

A análise termográfica realizada nos 51 animais do estudo seguiu os padrões já estabelecidos anteriormente (LOUGHIN, MARINO, 2007). As imagens captadas em ambiente fechado, sem corrente de ar, sem janelas, e com temperatura regulada por ar condicionado, quinze minutos após a tricotomia visaram o equilíbrio termal, evitando-se dessa forma alterações ambientais na imagem (MELO et al., 2015).

A termografia possui como vantagem ser um método não invasivo e rápido de diagnóstico, podendo ser considerada mais segura que métodos como a radiografia, tomografia e ressonância magnética, em que há exposição à radiação ionizante dos pacientes (WEERD et al., 2011). A facilidade na execução da técnica e a possibilidade de realização do exame em poucos segundos também favorecem o emprego do exame termográfico na rotina clínica, bem como a redução do valor das câmeras modernas propiciam um bom custo benefício ao exame (REDAELLI et al., 2014).

Observou-se que tanto AGCA como os ACGCA apresentaram pontos centrais e área tumoral mais frios que o esfíncter anal sadio adjacente, ou seja, ambos os tumores são mais frios que o esfíncter não tumoral, resultados semelhantes aos estudos de Konerding, Steinberg (1988) e Xie et al. (2004). A causa para essa alteração de temperatura não está bem esclarecida, porém a hipovascularização causada pela ineficácia da angiogênese tumoral (FOX et al., 1996) somada a elevada frequência de necrose intratumoral pode ter contribuído para o decréscimo das temperaturas tumorais.

Outra possibilidade levantada pelos autores é que abundante vascularização do esfíncter anal externo sadio o torna naturalmente mais quente quando comparado a pele, por exemplo. Em seu estudo, Melo (2017) fez análise de 63 aferições termográficas das áreas de pele sadia em cães para comparar com mastocitomas, obtendo uma média de 35,16°C. Ao se correlacionar esses dados com os do nosso estudo, podemos constatar que os esfíncteres anais sadios são mais quentes que a média padrão da pele. Dessa forma, esse aumento natural de temperatura dos

esfíncteres somada à necrose do tumor, podem ter contribuído para que os AGCA e ACGCA demonstrassem menor temperatura.

A termografia se mostrou um bom método diagnóstico complementar para os tumores AGCA e ACGCA, pois foi capaz de identificar uma temperatura diferente da área não tumoral, corroborando os dados referidos por Pavelski et al. (2015) e Melo et al. (2015). Em relação, a comparação da temperatura entre os dois tumores identificou-se que um número significativo de adenocarcinomas circum-anaís é mais frio que os adenomas, embora não seja estatisticamente significante, há um aumento de probabilidade de 17,45% de ser um adenocarcinoma quando há uma diferença maior ou igual a 1°C em relação a pele saudável. Portanto, quanto mais distantes os valores entre o tumor e o esfíncter sadio, maior a probabilidade de ser um ACGCA. Esses dados podem ser utilizados em conjunto a anamnese e exame citológico para uma chance maior de acerto no diagnóstico, e por conseguinte um melhor planejamento cirúrgico.

Não foi possível realizar análise estatística dos tumores ACASA visto que só tínhamos dados de um animal, nesta avaliação, o tumor mostrou-se ligeiramente mais quente que o esfíncter sadio adjacente. Estudos com um maior número de casos são necessários para caracterizar esses tumores.

O exame imuno-histoquímico para os marcadores Ki-67, CD-31 e VEGF foi realizado nos animais do estudo com objetivo de entender o comportamento das neoplasias e tentar determinar fatores prognósticos, no entanto para o grupo ACASA não foi possível realizar análise estatística devido ao reduzido número de animais que tiveram o bloco histológico recuperado no laboratório (n = 2).

O Ki-67 já é utilizado como prognóstico para diferentes neoplasias, em especial mastocitomas e melanomas (BERGIN et al., 2011; BLACKWOOD et al., 2012). Para formações de glândulas circum-anaís e de saco anal existe alguns trabalhos disponíveis em literatura como de Pereira et al. (2013), Brodzki et al. (2014), Wasques (2018) e para saco anal (SKORUPSKI et al., 2018). O nosso estudo observou que a média de valores de Ki-67 dos AGCA foi menor que ACGCA e ACASA, sendo 4,91; 9,02 e 17,55, respectivamente, esses valores são relativamente semelhantes aos encontrados em literatura. O resultado da média de Ki-67 para tumores AGCA se manteve entre o intervalo dos três trabalhos descritos anteriormente, sendo 1,7 relatado por Pereira et al. (2013), 7,33 por Brodzik et al. (2014) e 7,0 por Wasques (2018), havendo maior concordância com os últimos autores. Wasques (2018) questiona o trabalho de 2013 propondo que casos classificados como epitelomas na verdade

poderiam ser adenomas com atipias e reforça a necessidade de se padronizar os critérios de avaliação histológica. Em relação aos ACGCA o nosso valor se manteve bem abaixo do descrito por todos os autores, sendo Pereira et al (2013) 23%, Brodzik et al. (2014) 18,5 e de Wasques (2018) 17%, não sendo possível afirmar o porquê desta diferença, talvez a maioria dos nossos carcinomas eram classificados como bem diferenciados e diferenças metodológicas podem ocorrer entre os trabalhos. O aumento de Ki-67 não teve correlação estatística com parâmetros relacionados à sobrevida e recidiva, bem como a presença de metástases regionais ou à distância, e nem com a temperatura tumoral no exame termográfico. Porém existe correlação positiva significativa quando analisado o tamanho da formação, ou seja, adenomas e carcinomas circum-anaís maiores têm maior índice de Ki-67. Wasques (2018) define em seu trabalho um ponto de corte entre 6,5 e 7% do Ki-67 para diferenciação de tumores benignos e malignos, em nosso estudo obtivemos médias que corroboram o estudo prévio. Notou-se também que as neoplasias mais vascularizadas tendem a ter esse marcador mais elevado, porém o resultado não foi estatisticamente significativo, os autores sugerem estudos com um número maior de tomografias para uma melhor correlação dos dados

Em relação ao Ki-67 do grupo ACASA, obtivemos dois resultados bem heterogêneos, e não foi possível realizar a análise devido ao número reduzido de amostras, Skorupski et al (2018) e Suzuki et al. (2013) não encontraram correlação entre o aumento do marcador e diminuição de sobrevida ou frequência de recidiva como relatado em mastocitomas. Acredita-se que talvez ele não tenha importância prognóstica expressiva para este tipo tumoral, contudo, mais trabalhos são necessários.

Em relação ao marcador CD-31 os maiores valores obtidos foram nas formações benignas (AGCA). Não houve correlação estatística entre sobrevida e metástases à distância, como ocorre em humanos e descrito por Charpin et al. (1997). Também não houve relação entre vascularização e em nenhum parâmetro tomográfico descrito na tabela 2. No entanto, houve correlação estatística em relação ao tamanho tumoral, assim como o ki-67, neoplasias maiores apresentaram maiores valores de CD-31. Observou-se que tumores com aumento de CD-31 tiveram menor prevalência de metástases regionais, o oposto ao descrito em literatura humana (CHARPIN et al., 1997). E ACGCA mais frios tinham aumento significativo de CD-31. A expressão de CD-31 em tecidos sadios e tumorais em cães ainda não é bem estabelecida (RAMOS-VARA; MILLER; DUSOLD, 2018). Como não foram encontrados dados referentes ao CD-31 em tumores perianais, não é possível fazer uma comparação com dados em literatura, por isso, mais trabalhos são necessários.

A expressão de VEGF foi ligeiramente maior grupo ACGCA, porém não houve diferença estatística entre tumores ACGA e ACGCA, como ocorre em hemangiomas e hemangiossarcomas, por exemplo (CAMPOS et al., 2012). Estudos comparando a marcação de VEGF em adenomas e adenocarcinomas circum-anaís não foram encontrados, somente a expressão de VEGF sanguíneo em epitelomas e adenomas, conforme discutido no capítulo de revisão de literatura e Marchetti et al (2008) relataram uma maior concentração de VEGF em sangue periférico em pacientes que não responderam bem à quimioterapia metronômica.

Observamos correlação do marcador VEGF com área tumoral, assim como em Ki-67 e CD-31, por se tratar de marcadores de proliferação, é provável que tumores maiores tenham um índice proliferativo maior nos tumores estudados. Porém não houve correlação diagnóstica em relação a sobrevida, presença de metástases regionais e a distância, e tempo livre de doença. Diferente do que ocorre em outros tipos tumorais caninos, como o mastocitoma, em que o aumento de VEGF demonstrou significância prognóstica estando altamente relacionado com sobrevida (MELO, 2013; MELO, 2017). Em nosso estudo não é possível considerar o VEGF como fator prognóstico ainda, mais pesquisas nessa área são necessárias.

Em relação à terapia empregada no estudo, no grupo AGCA foi realizada somente a excisão cirúrgica, e orquiectomia nos machos não castrados. Em nenhum dos 23 cães em que conseguimos fazer o seguimento houve recidiva tumoral. Esse resultado confirma os dados descritos em literatura, já que os adenomas possuem taxa de recidiva baixa de cerca de 10% (WILLIAMS et al., 2003; PEREIRA et al., 2013; TUREK, WITHROW, 2013).

Para os cães do grupo III foi realizada somente a cirurgia e orquiectomia para os machos não castrados, já para os pacientes dos subgrupos II e IV, o protocolo adotado foi baseado no trabalho de Marchetti et al. (2011) em que se relatou o uso da quimioterapia metronômica com ciclofosfamida (25mg/ m²) e celecoxibe (2mg/kg) diariamente em 15 pacientes acometidos por neoplasias diversas, e dentre elas, um adenocarcinoma apócrino de saco anal. A dose empregada, no entanto foi baseada no trabalho de Burton et al. (2011) realizado com sarcomas comparando duas doses de ciclofosfamida (12,5 e 15mg/m²), sendo que a dose de 15mg/m² mostrou-se mais eficaz na inibição da angiogênese tumoral, na supressão de linfócitos T regulatórios e demonstrou menos efeitos colaterais que Marchetti et al. (2011). A associação do piroxicam ao protocolo se deve ao fato de que muitos carcinomas expressam COX-2 na superfície de suas células, e o uso de inibidores dessas substâncias ajudariam a inibir o crescimento tumoral (BENNET et al., 2002).

A quimioterapia metronômica teve boa tolerabilidade e efeitos adversos gastrointestinais leves, assim como descrito por Alexander et al. (2019). Apenas o cão C10 apresentou hiporexia e êmese grau 2 segundo a VCOC. Os efeitos classificados como grau 1 e 2 pela VCOC não justificam a suspensão da terapia, pois são contornáveis com tratamento suporte (VCOG, 2011), porém esse paciente foi eutanasiado devido a complicações da doença. Eichsradt et al. (2016) referiram o aumento de distúrbios gastrintestinais em animais idosos com o uso crônico do piroxicam, o paciente C10 tinha histórico de gastrite crônica e tal fato pode ter colaborado para o aparecimento desses efeitos adversos.

Em relação à toxicidade laboratorial, tivemos alterações de graus 1 e 2. Somente o cão C10 apresentou toxicidade grau 3, em t2, e teve o tratamento interrompido. No entanto, com o agravamento da doença não foi possível determinar se a trombocitopenia foi causada pela quimioterapia ou síndrome paraneoplásica. Sobre as alterações hepáticas, podem ter ocorrido devido à administração de ciclofosfamida, já que ela é metabolizada no fígado e segundo literatura pacientes com alterações prévias nesse órgão devem ser monitorados (RODASKI, DE NARDI, 2008).

Com relação a função renal a elevação de creatinina sérica pode ter sido causada tanto pela ciclofosfamida quanto o piroxicam isoladamente, ou então, a combinação dos dois, sabe-se que os AINEs podem inibir a síntese de prostaglandinas e por consequência diminuir o fluxo sanguíneo renal causando danos aos rins, e a duração do tratamento foi um fator de risco identificado por Matsuyama et al. (2017), no entanto, Eichsradt et al. (2016) não verificou alteração de função renal significativa nos pacientes que receberam piroxicam como escolha de tratamento. Em nosso estudo houve aumento discreto dos níveis de creatinina, não sendo necessária a interrupção do protocolo, porém sugerimos o monitoramento frequente desses pacientes.

Nenhum dos pacientes do estudo teve cistite hemorrágica durante o tratamento, assim como relatado por Alexander et al. (2019). Estudos prévios indicam uma porcentagem de 0 a 22% (BURTON et al., 2011; MITCHELL et al.; 2012) e 3,6 a 15,8% (CHAN et al., 2016; MATSUYAMA et al., 2017), de incidência de cistite hemorrágica estéril nos pacientes que receberam quimioterapia metronômica com ciclofosfamida. Além de não observar em nosso estudo a cistite hemorrágica, também não administramos furosemida conforme sugerido por Chan et al. (2016), que relatam a diminuição significativa de cistite administrando a ciclofosfamida concomitante com furosemida via oral. Matsuyama et al. (2017) conclui que a

incidência de cistite aumenta significativamente com o acúmulo da dose, porém em 6 meses de uso, isso não foi observado em nosso estudo.

O protocolo de quimioterapia metronômica teve boa aceitação pelos responsáveis; porém alguns desistiram da terapia e não retornaram, talvez devido ao tempo de tratamento, o qual foi de 6 meses. Dos tutores que seguiram o protocolo corretamente, todos relataram praticidade de administração e baixo custo de adesão. Além de, praticamente nenhum efeito adverso, sendo um tratamento seguro para ser usado nos animais com adenocarcinomas perianais e apócrinos de saco anal.

Não houve diferença estatística entre a sobrevida dos animais dos subgrupos II e III, ou seja, não houve ganho de sobrevida dos cães que fizeram quimioterapia metronômica adjuvante. Ao final do projeto, três animais do subgrupo II estavam vivos e 7 do subgrupo III (dos 12 que conseguimos contato). A maioria dos cães dos dois subgrupos vieram à óbito devido a causas diversas e não propriamente complicações da doença. A média de idade dos pacientes com carcinoma foi de 11 anos, nessa faixa etária muitos pacientes já possuem comorbidades ou desenvolvem durante o acompanhamento, o que justifica a taxa de óbito elevada por causas não tumorais, visto também que a taxa de metástases dos tumores ACGCA não é tão alta, variando entre 8 e 20% e a infiltração tumoral aparenta ser mais local do que em estruturas vizinhas (TUREK, WITHROW, 2013; FOSSUM, 2015; MCCOURT et al., 2018). No entanto, os 3 animais do subgrupo II que morreram em decorrência da doença tinham estadiamento T4 e pelo menos indícios metástase regional nos exames de imagem, e C12 também possuía duas formações nodulares em pulmão. Esses animais que fizeram quimioterapia tiveram sobrevida relativamente longa, sendo C8 660 dias, C12 e C28 480 dias cada. A presença de metástase no momento do diagnóstico aparenta diminuir consideravelmente a sobrevida dos pacientes. Foi observado também que os indícios de metástases foram encontrados em tumores maiores, majoritariamente em estágio T4. Hammer et al. (1994), referem o uso de Actinomicina D em dois casos de ACGCA, um com tempo livre de doença de 26 e o outro de 126 dias, sem cirurgia. Os estudos relatando tratamento quimioterápico adjuvante são escassos, encontra-se em literatura estudos com técnicas para controle local da neoplasia como eletroquimioterapia e radioterapia, evitando a recidiva que é relativamente frequente (MORGAN, CARLSON, 1963; GILLETTE, 1970; ANDERSON et al., 2002; TOZON et al., 2005; SPUGNINI et al., 2007), porém a terapia sistêmica passa a ser necessária nos casos de metástase regionais ou à distância para controle da doença, por isso novos estudos com mais animais são necessários, principalmente nos pacientes com metástase regional e à distância.

Devido ao caráter agressivo dos ACASA, não foi realizado grupo controle e os resultados foram comparados à literatura prévia. A média de sobrevida do presente trabalho foi de 534,99 dias, sendo muito baixa para C10 que possuía estadiamento T1N2bM1 (estágio 4), e sobrevida máxima de 1172 dias em C6 com estadiamento T4N0M0 (estágio 2). Turek et al. (2003) tiveram uma média de sobrevida global de 956 dias, para os cães que possuíam metástase regional no momento do diagnóstico e não tiveram a remoção dos linfonodos acometidos, a média caiu para 569 dias, para os que removeram os linfonodos a média foi de 906 dias. No nosso estudo não retiramos os linfonodos suspeitos de metástase. Bennet et al. (2002) fizeram um estudo retrospectivo e coletaram dados de diferentes tratamentos para ACASA, eles concluíram que os animais que fizeram cirurgia e quimioterapia adjuvante tiveram maior sobrevida, a média sobrevida global foi de 182,5 dias, porém pacientes com quimioterapia e sem metástases regionais chegaram até a 1230 dias. Willian et al. (2003) referem uma sobrevida global de 540 dias com cirurgia e quimioterapia combinadas (diferentes fármacos: carboplatina, doxorubicina, mitoxantrona, melfalano, actinomicina D, clorambucil), e 719 dias associando cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Animais que possuíam alterações em linfonodos tinham maior chance de receber quimioterapia. Emms (2005), obtiveram 600 dias de sobrevida para cães com metástase regional, neste estudo foram removidos os linfonodos metastáticos e uma média de sobrevida de 879 dias foi alcançada para cães sem indícios de metástase. Wouda et al. (2013) não encontraram diferença estatística entre cães tratados com cirurgia apenas e cirurgia com quimioterapia adjuvante (carboplatina), sendo a média de sobrevida de 761 dias para cães sem metástase regional e 448 dias para os que tinham, pacientes com metástase à distância não foram incluídos no projeto. Potanas; Padgett; Gamblin (2015) concluíram em seu estudo que a presença de metástase regional diminui significativamente a sobrevida dos pacientes, bem como não retirar os linfonodos alterados, o comprometimento de margens cirúrgicas não foi um fator significativo. Meier et al. (2016) referem uma maior sobrevida em cães que fizeram radioterapia do que cães que fizeram somente cirurgia, animais em estágio 3. Estudos com toceranib também foram realizados, Elliott (2019) relatou uso em ACASA estágio 4, sem cirurgia prévia, nenhum dos cães teve resposta parcial ou total, mas houve melhora nos sinais clínicos e a média de sobrevida foi de 356 dias. Heaton et al. (2020) também descreveram o uso de toceranib, porém estudos prospectivos e controlados são necessários. Comparando nossos resultados com a literatura disponível, nota-se ligeira semelhança em relação ao tempo de sobrevida, sendo C6 (estágio 2) com estadiamento T4N0M0 com 1172 dias. C10 e C77, ambos com estágio 4 tiveram sobrevida de 30 e 390 dias,

respectivamente. Devido ao pequeno número de animais tratados não é possível afirmar o sucesso da terapia, porém os resultados são promissores, dessa forma sugerimos estudos com um maior número de animais e a remoção dos linfonodos em pelo menos um dos grupos analisados.

Os dados encontrados em nosso estudo corroboram também com a literatura reiterando a capacidade metastática precoce da maioria dos tumores ACASA, porém também colaboram com a ideia de heterogeneidade das formações, já que neoplasias maiores não necessariamente propiciam menor sobrevida e nem presença de metástases. No entanto, Pradel et al. (2018), observaram relação positiva significativa do aumento de tamanho da neoplasia a presença de metástase, o que não foi observado neste estudo, talvez pelo pequeno número de cães. Bennet et al (2002) já atentaram para diversidade de comportamento dos ACASA, questionando se a terapia aplicada havia sido eficaz ou se os animais que tiveram maior sobrevida teriam a variante mais lenta do tumor. Devido a essa variabilidade de taxa metastática e tempo de sobrevida somado ao pouco conhecimento sobre o significado prognóstico histopatológico, Pradel et al. (2018) realizaram um estudo retrospectivo analisando 39 ACASAS, relacionando as características clínicas e histopatológicas, verificando que 62% tiveram margens cirúrgicas comprometidas e estes, 74% possuíam infiltração periférica moderada a acentuada. Com padrão de crescimento sólido, tubular/rosetas/pseudorosetas e papilares em 49%, 46% e 5% dos casos, respectivamente. Esses aspectos histológicos, exceto contagem de mitoses e necrose, foram associados à metástase e pior prognóstico, porém estudos mais abrangentes são necessários. Os autores do presente estudo sugerem que seria interessante criar uma classificação histológica, como é feito em mastocitomas, por exemplo, para os tumores apócrinos de saco anal para melhor caracterização tumoral, bem como tratamento e análise de prognóstico.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÕES

Ao término do estudo concluímos que:

- I. A citologia se mostrou um bom método de diagnóstico para os tumores perianais e os adenocarcinomas de saco anal caninos.
- II. O exame termográfico possibilita a diferenciação entre a área tumoral e área sadia nos tumores perianais caninos.
- III. A taxa de Ki-67 é significativamente maior em adenocarcinomas circum-anais e o seu aumento está relacionado ao tamanho tumoral.
- IV. A quimioterapia metronômica adjuvante se mostrou eficaz para o tratamento dos adenocarcinomas apócrinos de saco anal, sendo segura e de fácil administração, além de proporcionar qualidade de vida, sem efeitos adversos relevantes.

8 REFERÊNCIAS

ZANUTO, E. B. M.

8 REFERÊNCIAS

- ACOCK, A. C. **A Gentle Introduction to Stata**. 4th ed. 2014, College Station, TX: Stata Press
- AGNEW, D. W, et al. **Tumors of the genital systems**. IN: MEUTEN, D. J., ed. Tumors in domestic animals. 5 ed., p. 689–722, 2017, IOWA, John Wiley and Sons.
- ALEXANDER, C. K.; CRONIN, K. L.; SILVER, M.; GARDNER, H. L.; LONDON, C. The addition of metronomic chemotherapy does not improve outcome for canine splenic hemangiosarcoma. **Journal of Small Animal Practice**, v. 60, n. 1, p. 32-37, 2019.
- AMANO, K.; FUKUCHI, M.; KUMAMOTO, K.; HATANO, S.; OHNO, H.; OSADA, H.; ISHIDA, H. Pre-operative Evaluation of Lateral Pelvic Lymph Node Metastasis in Lower Rectal Cancer: Comparison of Three Different Imaging Modalities. **Journal of the anus, rectum and colon**, v. 4, n. 1, p. 34 - 40, 2020.
- AMRI, A.; PULKO, S. H.; WILKINSON, A. J. Potentialities of steady-state and transient thermography in breast tumour depth detection: A numerical study. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 123, p. 68-80, 2016.
- ANDERSON, C. R.; MCNIEL, E. A.; GILLETTE, E. L.; et al. Late complications of pelvic irradiation in 16 dogs, **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 43, n. 2, p. 187–192, 2002.
- ANDERSON C. L.; MACKAY, C.S., ROBERTS, G. D., FIDEL, J. Comparison of abdominal ultrasound and magnetic resonance imaging for detection of abdominal lymphadenopathy in dogs with metastatic apocrine gland adenocarcinoma of the anal sac. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 13, n. 2, p. 98–105, 2013.
- ARAÚJO, M. C.; LIMA, R. C. F.; DE SOUZA, R. M. C. R. Interval symbolic feature extraction for thermography breast cancer detection. **Expert Systems with Applications**, v. 41, n. 15, p. 6728-6737, 2014.
- ARONSON, L., 2003. Rectum and anus. In: Slatter, D. (Ed.), **Textbook of Small Animal Surgery**, 3 ed. 2003, Elsevier Science, USA, pp. 688–689.
- ARORA, A.; SCHOLAR, E. M. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 315, p. 971-979, 2005.
- ASSUNÇÃO, K. A. **Estudo clínico cirúrgico, citológico e histopatológico de tumores perianais em cães**. 2003. 81f. Tese (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2003.
- BACHA, W. J. Jr; BACHA, L. Digestive system. In: **Color atlas of veterinary histology**, 2 ed., 2000, p. 119–162. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- BARNES, D.C.; DEMETRIOU, J.L. Surgical management of primary, metastatic and recurrent anal sac adenocarcinoma in the dog: 52 cases, **Journal of Small Animal Practice**, v. 58, p. 263-268, 2017)
- ZANUTO, E. B. M.

- BELEHRADEK, JR., J.; ORLOWSKI, S.; PODDEVIN, B.; PAOLETTI C.; MIR L. M. Electrochemotherapy of spontaneous mammary tumours in mice. **Europe Journal of Cancer**, v. 27, p 73 -76, 1991.
- BELEHRADEK, M.; DOMENGE, C.; LUBOINSKI, B.; ORLOWSKI, S.; BELEHRADEK, JR. J.; MIR, L. M. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial. **Europe Journal of Cancer**, v. 12, p. 3694-3700, 1993.
- BENNETT, P. F.; DENICOLA, D. B.; BONNEY, P. et al: Canine anal sac adenocarcinomas: clinical presentation and response to therapy, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p.100–104, 2002.
- BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature Reviews Cancer**, v.3, p. 401-410, 2003.
- BERGIN, I. L.; SMEDLEY, R. C.; ESPLIN, D. G.; SPANGLER, W. L.; KIUPEL, M. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 41-53, 2011.
- BERGMAN, P. J. Paraneoplastic hypercalcemia. **Topics in companion animal medicine**, v. 27, n. 4, p. 156-158, 2012.
- BERROCAL, A.; VOS, J. H.; VAN DEN INGH, T. S. et al. Canine perineal tumors. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 36, p. 739–749, 1989.
- BILLER, B. Metronomic chemotherapy in veterinary patients with cancer: rethinking the targets and strategies of chemotherapy. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 44, p. 817-829, 2014.
- BLACKWOOD, L.; MURPHY, S.; BURACCO, P.; DE VOS, J. P.; DE FORNEL-THIBAUD, P.; HIRSCHBERGER, J.; ... & ARGYLE, D. J. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and comparative oncology**, v. 10, n. 3, p. e1-e29, 2012.
- BLAZQUEZ, N. B.; FRENCH, J. M.; LONG, S. E; PERRY, G. C. A pheromonal function for the perineal skin glands in the cow. **The Veterinary Record**, v. 123, p. 49 – 50, 1988.
- BOOTHE, H. W. Reproductive System - Testes and Epididymides. D. Slatter (Ed.), **TEXTBOOK OF SMALL ANIMAL SURGERY**, 3 ed., V. 2, p. 1521 - 1531. Philadelphia: Saunders, 2003.
- BOWLT, K. L.; FRIEND, E. J.; DELISSER, P.; MURPHY, S.; POLTON, G. (2013). Temporally separated bilateral anal sac gland carcinomas in four dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 54, n. 8, p. 432-436, 2013.
- BRIOSCHI, M. L.; MACEDO, J. F; MACEDO R. A. C. Termometria cutânea: novos conceitos. **Jornal Vascular Brasileiro**, n. 01, c. 2, p. 151 – 160, 2003.
- BRODZKI, A.; ŁOPUSZYŃSKI, W.; BRODZKI P.; TATARA, M. R. Diagnostic and Prognostic Value of Cellular Proliferation Assessment with Ki-67 Protein in Dogs Suffering from Benign and Malignant Perianal Tumors. **Folia Biologica**, v. 62, n.3, 2014a.
- ZANUTO, E. B. M.

- BRODZKI, A.; SOBCZYŃSKA-RAK, A.; BRODZKI, P.; TATARA, M. R.; SILMANOWICZ, P. Occurrence, etiology and antihormonal treatment of perianal gland tumors in male dogs. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 70, n. 10, p. 638-643, 2014b.
- BROWN, R. J.; NEWMAN, S. J.; DURTSCHI, D. C.; LEBLANC, A. K. Expression of PDGFR- β and Kit in canine anal sac apocrine gland adenocarcinoma using tissue immunohistochemistry. **Veterinary and comparative oncology**, v. 10, n. 1, p. 74-79, 2012.
- BURTON, J. H.; MITCHELL, L.; THAMM, D. H.; DOW, S. W.; BILLER, B. J. Low-dose cyclophosphamide selectively decreases regulatory T cells and inhibits angiogenesis in dogs with soft tissue sarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, p. 920-926, 2011.
- BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Rocca, 2004. 384p.
- CAMACHO, L.; PEÑA, L.; GIL, A. G.; MARTÍN-RUIZ A.; DUNNER, S.; ILLERA, J. C. Immunohistochemical vascular factor expression in canine inflammatory mammary carcinoma. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 4, p. 737-748, 2014.
- CAMPOS, A. G.; CAMPOS, J. A. D. B.; SANCHES, D. S.; DAGLI, M. L. Z.; MATERA, J. M. Immunohistochemical evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in splenic hemangiomas and hemangiosarcomas in dogs. **Open Journal of Veterinary Medicine**, n 2, p. 191 -195, 2012.
- CARVALHO, M. I.; PIRES, I.; PRADA, J., et al. High COX-2 expression is associated with increased angiogenesis, proliferation and tumoural inflammatory infiltrate in canine malignant mammary tumours: a multivariate survival study. **Veterinary and comparative oncology**, v. 15, n. 2, p. 619-631, 2016.
- CHAN, C. M.; FRIMBERGER, A. E.; MOORE, Antony S. Incidence of sterile hemorrhagic cystitis in tumor-bearing dogs concurrently treated with oral metronomic cyclophosphamide chemotherapy and furosemide: 55 cases (2009–2015). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 249, n. 12, p. 1408-1414, 2016.
- CHARPIN, C.; GARCIA, S.; BOUVIER, C.; MARTINI, F.; ANDRAC, L.; BONNIER, P.; ... & ALLASIA, C. CD31/PECAM automated and quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas: correlation with patient follow-up. **American journal of clinical pathology**, v. 107, n. 5, p. 534-541, 1997.
- CEMAZAR, M.; TAMZALI, Y.; SERSA, G., et al. Electrochemotherapy in veterinary oncology. **Journal of veterinary internal medicine** / American College of Veterinary Internal Medicine, v. 22, n. 4, p. 826–31, 2008.
- CHEUNG, K.; MA, L.; WANG, G.; COE, D.; FERRO, R.; FALASCA, M.; MARELLI-BERG, F. M. et al. CD31 signals confer immune privilege to the vascular endothelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 43, p. E5815-E5824, 2015.
- CHU, E. Princípios de oncologia clínica. In: HOFF, P. M. G.; KATZ, A.; CHAMMAS R.; ODONE, V. F.; NOVIS, Y. S. **Tratado de Oncologia**, v. 1, 1 ed., Atheneu: São Paulo, c. 45, p. 617-629, 2013.
- ZANUTO, E. B. M.

CUSTEAD, M.R.; WENG, H.Y.; CHILDRESS, M.O. Retrospective comparison of three doses of metronomic chlorambucil for tolerability and efficacy in dogs with spontaneous cancer. **Veterinary Comparative Oncology**, 2016.

CREASY, D.; BUBE, A.; RIJK, E. et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. **Toxicologic Pathology**, v. 40, p 40- 121, 2012.

DE SWARTE, M.; ALEXANDER, K.; RANNOU, B. et al. Comparison of sonographic features of benign and neoplastic deep lymph nodes in dogs. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 52, p. 451–456, 2011.

DELISSER, H. M.; NEWMAN, P. J.; ALBELDA, S. M. Platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31). *Curr Topics Microbiology Immunology*, v. 184, p. 37- 45, 1993.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. 4. ed, p. 904 – 905. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

DOBSON, J. M. Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. **ISRN veterinary science**, v. 2013, 2013.

DOMENGE, C.; ORLOWSKI, S.; LUBOINSKI, B.; DE BAERE, T.; BELEHRADEK, JR. J.; MIR, L. M. Antitumor electrochemotherapy: new advances in the clinical protocol. **Europe Journal of Cancer**, v.77, p. 956–63, 1996.

DOW, S. W.; OLSON, P. N.; ROSYCHUK, R. A.; WITHROW, S. J. Perianal adenomas and hypertestosteronemia in a spayed bitch with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. **Journal of Veterinary medical Association**, v. 192, p. 1439-1441, 1998.

EICHSTADT, L. R.; MOORE, G. E.; CHILDRESS, M. O. Risk factors for treatment-related adverse events in cancer-bearing dogs receiving piroxicam. **Veterinary and comparative oncology**, v. 15, n. 4, p. 1346-1353, 2017.

ELLIOT, W. J. Response and outcome following toceranib phosphate treatment for stage four anal sac apocrine gland adenocarcinoma in dogs: 15 cases (2013–2017). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 254, p. 960 – 966, 2019.

ELMSLIE, R. E.; GLAWE, P.; DOW, S. E. Metronomic therapy with cyclophosphamide and piroxicam effectively delays tumor recurrence in dogs with incompletely resected soft tissue sarcomas. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p.1373-1379, 2008.

ELLING, H.; UNGEMACH, F. R. Demonstration of oestrogen receptors in perianal tumours in dogs. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin**, n. 9/10, p. 758-764, 1980.

EMMS, S. G. Anal sac tumours of the dog and their response to cytoreductive surgery and chemotherapy, **Australian Veterinary Journal**, v. 83, n. 6, p. 340–343, 2005.

ENGIN, G. Endosonographic imaging of anorectal diseases. **Journal of Ultrasound Medicine**, v. 25, n.1, p. 57–73, 2006.

ZANUTO, E. B. M.

EURELL, J. A.; FRAPPIER, B. L. **Histologia veterinária de Dellmann**. 6. ed. Barueri: Manole, p. 339 – 340, 2012.

EVANS, H. E.; LAHUNTA, A. **Miller's anatomy of the dog**, 4 ed, p. 75 St. Louis: Elsevier Saunders, 2013.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Disorders of the Testes and Epidymides. In E. C. Feldman & R. W. Nelson (Eds.), **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction** (3 ed., p. 961 - 977). St. Louis Missouri: WB Saunders Co, 2004.

FERNANDES, C. C.; MEDEIROS, A. A.; MAGALHÃES, G. M.; SZABÓ, M. P. J.; DE QUEIROZ, R. P.; DA SILVA, M. V. A.; SOARES, N. P. Frequência de neoplasias cutâneas em cães atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia durante os anos 2000 a 2010. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 2, 2015.

FINNIE, J. W.; BOSTOCK, D. E. Skin neoplasia in dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 55, n. 12, p. 602-604, 1979.

FOLKINS, C.; MAN, S.; XU, P.; SHAKED, Y.; HICKLIN, D.; KERBEL, R. S. Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors. **Cancer Research**, v. 67, p. 3560-3564, 2007.

FOX, S. B.; GATTER, K. C.; HARRIS, A. L. Tumour angiogenesis. **The Journal of pathology**, v. 179, n. 3, p. 232-237, 1996.

FOSSUM, T. W. Afecções do trato gastrointestinal. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**, 4 ed. Elsevier, 2015.

FRAISL, P.; MAZZONE, M.; SCHMIDT, T.; CARMELIET, P. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. **Developmental Cell**, v. 16, p. 167-179, 2009.

GANGULY, A.; WOLFE, L. G. Canine perianal gland carcinoma-associated antigens defined by monoclonal antibodies. **Hybridoma**, v. 25, n. 1, p. 10–4, 2006.

GARCIA, E. F. V.; LOUGHIN, C. A.; MARINO, M. J. et al. **Medical infrared imaging and orthostatic analysis to determine lameness in the pelvic limbs of dogs**. Open Veterinary Journal, v. 7, n. 4, p. 342 – 348, 2017.

GASPAR, T. B.; HENRIQUES, J.; MARCONATO, L.; QUEIROGA, F. L. The use of low-dose metronomic chemotherapy in dogs—insight into a modern cancer field. **Veterinary and comparative oncology**, v. 16, n. 1, p. 2-11, 2018.

GATELY, S.; KERBEL, R. Therapeutic potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in the management of tumor angiogenesis. **Progress in Experimental Tumor Research**, n. 37, p. 179–192, 2003.

GAUTHERIE, M. Thermopathology of breast cancer: measurement and analysis of in vivo temperature and blood flow. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 335, n. 1, p. 383-415, 1980.

ZANUTO, E. B. M.

GEHL J.; SKOVSGAARD T.; MIR L. M. Vascular reactions to in vivo electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery. **Biochimica et Biophysica Acta**; v. 1569, p. 51 – 58, 2002.

GERDES, J.; SCHUETER, C. L. L.; DUCHROW, M.; WOHLLENBERG, C.; GERLACH, C.; STAHLER, I.; KLOTH, S.; BRANDT, E.; FLAD, H. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **American Journal of Pathology**, n.138, p.867–873, 1991.

GHIRLANDA, S.; ACERBI, A.; HERZOG, H.; SERPELL, J. A. Fashion vs. function in cultural evolution: The case of dog breed popularity. **PLoS One**, v. 8, n. 9, 2013.

GILLETTE, E. L. Veterinary radiotherapy, **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 157, n.11, p.1707–1712, 1970.

GOLDSCHMIDT, M. H.; ZOLTOWSKI, C. Anal sac gland adenocarcinoma in the dog: 14 cases, **Journal of Small Animal Practice**, v. 22, p. 119–128, 1981.

GOLDSCHMIDT, M. H.; DUNSTAN, R. W.; STANNARD, A. A.; VON TSCHARNER, E. J.; WALDER, E. J.; YAGER, J. A. Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals. AFIP, Washington, DC: **WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals**; 2002.

GOLDSCHMIDT, M. H.; GOLDSCHMIDT, K. H. Epithelial and melanocytic tumors of the skin. **Tumors in domestic animals**, v. 5, p. 129-131, 2016.

GOLDSCHMIDT, M. H.; SHOFER, F. S. **Skin tumors of the dog and the cat**. Butterworth Heinemann, Oxford: 1992.

GONZALEZ-HERNANDEZ, J. L.; RECINELLA, A. N.; KANDLIKAR, S. G.; DABYDEEN, D., MEDEIROS, L. PHATAK, P. Technology, application and potential of dynamic breast thermography for the detection of breast cancer. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 131, p. 558-573, 2018.

GREENE, W. H (2012): Econometric Analysis.

GRÖNE, A.; WERKMEISTER, J. R.; STEINMEYER, C. L.; CAPEN, C. C.; ROSOL, T. J. Parathyroid Hormone-related Protein in Normal and Neoplastic canine Tissues: Immunohistochemical Localization and Biochemical Extraction. **Veterinary Pathology**, v. 31, p. 308-313, 1994.

GROSS, T. L.; IHRKE, P.; WALDER, E.J.; AFFOLTER, V.K.; BLACKWELL, O. Sebaceous tumors. In **Skin diseases of the Dog and Cat. Clinical and Histopathologic Diagnosis. 2nd edition**. Edited by Gross TL, Ihrke P, Walder EJ, Affolter VK, Blackwell O. Oxford: Blackwell Science, p.625–648, 2005.

GUSTAFSON, D. L.; PAGE, R. L. Cancer chemotherapy. In: Withrow, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. **Small Animal Clinical Oncology**. 5 ed. Elsevier: St. Louis, 2013, c. 11, p. 157-179.

ZANUTO, E. B. M.

HAFNER, C.; REICHLE, A.; VOGT, T. New indications for established drugs: combined tumor-stroma-targeted cancer therapy with PPAR γ agonists, COX-2 inhibitors, mTOR antagonists and metronomic chemotherapy. **Current Cancer Drugs Targets**, v. 5, p. 393-419, 2005.

HAMMER, A. S.; COUTO, C. G.; AYL, R. D. et al. Treatment of tumor bearing dogs with actinomycin D, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 8, n. 3, p.236–239, 1994.

HANAHAN, D.; BERGERS, G.; BERGSLAND, E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in a mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, p. 1045-1047, 2000.

HEATON, C. M.; FERNANDES, A. F.; JARK, P. C.; PAN, X. Evaluation of toceranib for treatment of apocrine gland anal sac adenocarcinoma in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 2020.

HILL, K. E.; SCOTT-MONTRIEFF, C. R.; KOSHKO, M. A. et al. Secretion of sex hormones in dogs with adrenal dysfunction, **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 226, p. 556–561, 2005.

HOELZLER, M.G.; BELLAH, J; R.; DONOFRO. Omentalization of cystic sublumbar lymph node metastases for long-term palliation of tenesmus and dysuria in a dog with anal sac adenocarcinoma. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 210, n. 12, p. 1729 – 1731, 2001.

HORNAKOVA, L.; VRBOVSKA, T.; PAVL'AK, M.; VALENCAKOVA-AGYAGOSOVA, A. HALO, M.; HAJURKA, J. The evaluation of blood concentrations of testosterone, 17 β -oestradiol and anti-Mu ℓ lerian hormone in dogs with cryptorchidism and testicular tumours. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 20, n. 4, p. 677-685, 2017.

JAROSZ, P.; WOZNIAK, B. Angiogenesis in cancer diseases, **Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu**, v.4, p. 498-507, 2012.

KANDLIKAR, S. G.; PEREZ-RAYA, I.; RAGHUPATHI, P. A.; GONZALEZ-HERNANDEZ, J. L.; DABYDEEN, D.; MEDEIROS, L.; PHATAK, P. Infrared imaging technology for breast cancer detection—Current status, protocols and new directions. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 108, p. 2303-2320, 2017.

KHAN, A.; MASROOR, I.; & KHANDWALA, K. Utility of Ultrasound and Mammography in Detection of Negative Axillary Nodal Metastasis in Breast Cancer. **Cureus**, v. 12, n1, e6691, 2020.

KALDRYMIDOU, H. et al. Prevalence, distribution and factors associated with the presence and the potential for malignancy of cutaneous neoplasms in 174 dogs admitted to a clinic in northern Greece. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 49, n. 2, p. 87-91, 2002.

KERBEL, R. S.; KAMEN, B. A. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 6, p. 423-436, 2004.

ZANUTO, E. B. M.

KIM, J. H.; PARK, H. M. Unilateral Femoral Arterial Thrombosis in a Dog with Malignant Mammary Gland Tumor: Clinical and Thermographic Findings, and Successful Treatment with Local Intra-arterial Administration of Streptokinase. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 5, p. 657 – 661, 2012.

KIMURA, K. C.; GÁRATE, A. P.; DAGLI, M. L. Z. Retrospective study of neoplasms in domestic animals: A survey between 1993 and 2002 of the service of animal pathology, department of pathology, school of veterinary medicine and animal science, University of Sao Paulo, Southeast Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 5, n. 2, p. 60-69, 2012.

KONERDING, M. A.; STEINBERG, F. Computerized infrared thermography and ultrastructural studies of xenotransplanted human tumors on nude mice. **Thermology**, n. 3, p. 7 – 14, 1988.

KNUDSEN, C. S.; WILLIAMS, A.; BREARLEY, M. J.; & DEMETRIOU, J. L. COX-2 expression in canine anal sac adenocarcinomas and in non-neoplastic canine anal sacs. **The veterinary journal**, v. 197, n. 3, p. 782-787, 2013.

KULS, N.; BLISSITT, K. J.; SHAW, D. J.; SCHOFFMANN, G.; CLUTTON, R. E. Thermography as an early predictive measurement for evaluating epidural and femoral sciatic block success in dogs. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, p. 1 – 11, 2017.

LANA, S.; U'REN, L.; PLAZA, S.; ELMSLIE, R.; GUSTAFSON, D.; MORLEY, P.; DOW, S. Continuous low-dose oral chemotherapy for adjuvant therapy for splenic hemangiosarcoma in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 764 - 769, 2007

LABRES-DIAZ, F. J. Ultrasonography of the medial iliac lymph nodes in the dog. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 45, p. 156–165, 2004.

LEAHY, K. M.; OMBERG, R. L.; WANG, Y et al. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. **Cancer Research**, n. 62, p. 625–631, 2002.

LERTKIATMONGKOL, P.; LIAO, D.; MEI, H.; HU, Y.; NEWMAN, P. J. Endothelial functions of PECAM-1 (CD31). **Current opinion in hematology**, v. 23, n. 3, p. 253, 2016.

LIEN, K.; GEORGS DOTTIR, S.; SIVANATHAN, L.; CHAN, K.; EMMENEGGER, U. Low-dose metronomic chemotherapy: a systematic literature analysis. **European Journal of Cancer**, v. 49, p. 3387-3395, 2013.

LONDON, C.; MATHIE, T.; STINGLE, N. et al: Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia) in solid tumours, **Veterinary Comparative Oncology**, Epub ahead of print, 2011.

LOPES, A. C.; CHAMMAS, R.; YYEYASU, H. **Oncologia para graduação**. 3ª ed. Ed. Lemar, São Paulo, p. 220-239, 2013.

LOUGHIN, C. A.; MARINO, D. J. Evaluation of thermographic imaging of the limbs of healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 10, p. 1064 – 1069, 2007.

ZANUTO, E. B. M.

MACLACHLAN, N. J.; KENNEDY, P. C. Tumors of the genital system. **Tumors in Domestic Animals**, 4 ed, DJ Meuten, Ed., Iowa State Press, Ames, p. 561-564, 2002.

MAITI, R. Metronomic chemotherapy. **Journal of Pharmacology Pharmacother**, v.5, n.3, p. 186192, 2014.

MALONE, E. K.; RASSNICK, K.M.; BAILEY, D.B.; KISELOW, M.A.; ERB, H.N. Comparison of two questionnaires to assess gastrointestinal toxicity in dogs and cats treated with chemotherapy. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 9, n. 3, p. 225-231, 2011.

MARCHETTI, V.; GIORGI, M.; FIORAVANTI, A.; FINOTELLO, R.; CITI, S.; CANU, B.; ORLANDI, P.; DESIDERO, T.; DANESI, R.; BOCCI, G. First-line metronomic chemotherapy in a metastatic model of spontaneous canine tumours: a pilot study. **Investigational New Drugs**, v.30, p. 1725-1730, 2012.

MARCONATO, L.; CHALFON, C.; FINOTELLO, R.; POLTON, G.; VASCONI, M. E.; ANNONI, M.; AMATI, M. Adjuvant anthracycline-based vs metronomic chemotherapy vs no medical treatment for dogs with metastatic splenic hemangiosarcoma: A multi-institutional retrospective study of the Italian Society of Veterinary Oncology. **Veterinary and comparative oncology**, v. 17, n. 4, p. 537-544, 2019.

MARINO, M. A.; AVENDANO, D.; ZAPATA, P.; RIEDL, C. C.; & PINKER, K. Lymph Node Imaging in Patients with Primary Breast Cancer: Concurrent Diagnostic Tools. **The oncologist**, v. 25, n. 2, e231, 2020.

MARINO, D. J.; LOUGHIN, C. A. Diagnostic imaging of the canine stifle: a review. **Veterinary Surgery**, v. 39, n. 03, p. 284 – 295, 2010.

MARTINS A.M.; VASQUES-PEYSER A.; TORRES L.N.; MATERA J.M., DAGLI M.L.; GUERRA J. L. Retrospective–systematic study and quantitative analysis of cellular proliferation and apoptosis in normal hyperplastic and neoplastic perianal glands in dogs. **Veterinary Comparative Oncology**, n. 6, p. 71-79, 2008.

MAYER, M. N.; LAWSON, J. A.; SILVER, T. I. Sonographic characteristics of presumptively normal canine medial iliac and superficial inguinal lymph nodes. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v.51, p. 638–641, 2010.

MATSUYAMA, A.; POIRIER, V. J.; MANTOVANI, F.; FOSTER, R. A.; MUTSAERS, A. J. Adjuvant doxorubicin with or without metronomic cyclophosphamide for canine splenic hemangiosarcoma. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 53, n. 6, p. 304-312, 2017.

MATSUYAMA, A.; SCHOTT, C. R.; WOOD, G. A.; RICHARDSON, D.; WOODS, J. P.; MUTSAERS, A. J. Evaluation of metronomic cyclophosphamide chemotherapy as maintenance treatment for dogs with appendicular osteosarcoma following limb amputation and carboplatin chemotherapy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 252, n. 11, p. 1377-1383, 2018.

ZANUTO, E. B. M.

MCCOURT, M. R.; LEVINE, G. M.; BRESHEARS, M. A.; WALL, C. R.; MEINKOTH, J. H. Metastatic disease in a dog with a well-differentiated perianal gland tumor. **Veterinary clinical pathology**, v. 47, n. 4, p. 649-653, 2018.

MEIER, V.; BESSERER, J.; ROOS, M.; ROHRER BLEY, C. A complication probability study for a definitive-intent, moderately hypofractionated image-guided intensity-modulated radiotherapy protocol for anal sac adenocarcinoma in dogs. **Veterinary and comparative oncology**, v. 17, n. 1, p. 21-31, 2019.

MELO, S. R. **Fatores prognósticos em mastocitoma canino: correlação entre parâmetros clínicos, histológicos, marcadores de proliferação e análise termográfica**. 2013. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo.

MELO, S. R.; MACEDO, T. R.; COGLIATI, B.; FERRIGNO, C. R. A.; MATERA, J.M. Thermographic assessment of the canine mast cell tumors. **Indian Journal of Applied Research**, v. 5, ed. 3, p. 47 – 51, 2015.

MELO, S. R. **Estudo crítico de mastocitomas caninos e avaliação termográfica de técnicas de anaplastia**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2017.

MEIRELLES, A. E.; OLIVEIRA, E. C.; RODRIGUES, B. A.; COSTA, G. R.; SONNE, L.; TESSER, E. S.; DRIEMEIER, D. Prevalência de neoplasmas cutâneos em cães da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS: 1.017 casos (2002-2007). **Pesquisa veterinária brasileira**, v. 30, n. 11, p. 968-973, 2010.

MESSINGER, J. S.; WINDHAM, W. R.; WARD, C. R. Ionized hypercalcemia in dogs: a retrospective study of 109 cases (1998–2003). **Journal of veterinary internal medicine**, v. 23, n. 3, p. 514-519, 2009.

MEUTEN, D. J.; ARMSTRONG, P. J. Moléstias da paratireoide e metabolismo do cálcio. In ETTINGER, S. J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**, 3 ed, v.3, p. 1683 – 1688, 1992.

MIRANDA, Bruna de Castro. **Quimioterapia metronômica como tratamento adjuvante para o mastocitoma cutâneo em cães**. 2017. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo.

MITCHELL, L; THAMM, D. H.; BILLER, B. J. Clinical and immunomodulatory effects of toceranib combined with low-dose cyclophosphamide in dogs with cancer. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, p. 355-362, 2012.

MOULTON, J. E. **Tumors in Domestic Animals**, 3rd ed. University of California Press, Berkeley, 1990.

MORGAN, J. P.; CARLSON, W. D. X-irradiation of perianal gland neoplasms in the dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 143, p. 1227, 1963.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Distúrbios do trato intestinal. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**, 2 ed. Elsevier, 2010, p. 471 – 472.

NIELSEN, S. W.; ATTOSMIS, J. Canine perianal gland tumors. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 144, p.127 – 135, 1964.

ZANUTO, E. B. M.

NOWAKOWSKI, A. Advantages of quantitative in-thermal medical diagnostics. **International Conference on Quantitative Infrared Thermography**, p. 143 – 145. 2006.

NØDTVEDT, A.; GAMLEM, H.; GUNNES, G.; GROTMOL, T.; INDERBØ, A.; MOE, L. Breed differences in the proportional morbidity of testicular tumours and distribution of histopathologic types in a population-based canine cancer registry, **Veterinary Comparative Oncology**, v. 9, p 45–54, 2011.

OWEN, L. N., et al. **TNM Classification of Tumours in Domestic Animals/edited by LN Owen**. Geneva: World Health Organization, 1980.

ORLOWSKI S.; BELEHRADEK J. Jr.; PAOLETTI, C.; MIR L. M. Transient electroporation of cells in culture. Increase in cytotoxicity of anticancer drugs, **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 4727–4733, 1988.

PADURA-MARTIN, I.; MARIGHETTI, P.; AGLIANO, A.; COLOMBO, F.; LARZABAL, L.; REDRADO, M.; BLEAU, A. M.; PRIOR, C.; BERTOLINI, F.; CALVO, A. Residual dormant cancer stem-cell foci are responsible for tumor relapse after antiangiogenic metronomic therapy in hepatocellular carcinoma xenografts. **Laboratory Investigation**, v. 92, p. 952-966, 2012.

PALLADINO, S.; KEYSERLEBER, M. A.; KING, R. G.; BURGESS, K. E. Utility of Computed Tomography versus Abdominal Ultrasound Examination to Identify Iliosacral Lymphadenomegaly in Dogs with Apocrine Gland Adenocarcinoma of the Anal Sac, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, p. 1858 – 1863, 2016.

PAVELSKI, M., SILVA, D. M., JUNIOR, D. A., SOUSA, R. S., GUÉRIOS, S. D., DORNBUSCH, P. T. Infrared Thermography in Dogs with Mammary Tumors and Healthy Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, p. 1578–1583, 2015.

PEREIRA, R. S.; SCHWEIGERT, A.; DIAS DE MELO, G.; et al. Ki-67 labeling in canine perianal glands neoplasms: a novel approach for immunohistological diagnostic and prognostic. **BMC veterinary research**, v. 9, p. 83, 2013.

PISANI, G.; MILLANTA, F.; LORENZI, D.; VANOZZI, I.; POLI, A. Androgen receptor expression in normal, hyperplastic and neoplastic hepatoid glands in the dog. **Research Veterinary Science**, v. 8, p. 231-236, 2006.

POLJAK-BLAZI, M.; KOLARIC, D.; JAGANJAC, M.; ZARKOVIC, K.; SKALA, K.; ZARKOVIC, N. Specific thermographic changes during Walker 256 carcinoma development: Differential infrared imaging of tumour, inflammation and haematoma. **Cancer detection and prevention**, v. 32, n. 5-6, p. 431-436, 2009.

POLTON, G. A.; MOWAT, V.; LEE, H. C.; MCKEE, K. A.; SCASE, T. J. Breed, gender and neutering status of British dogs with anal sac gland carcinoma. **Veterinary and comparative oncology**, v. 4, n. 3, p. 125-131, 2006.

POLTRON, G.A.; BREARLEY, M.J. Clinical stage, therapy, and prognosis in canine anal sac gland carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p.274–280, 2007.

ZANUTO, E. B. M.

POTANAS, C.; PADGETT, S.; GAMBLIN, R. M. Surgical excision of anal sac apocrine gland adenocarcinomas with and without adjunctive chemotherapy in dogs: 42 cases (2005–2011). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 246, n. 8, p. 877-884, 2015.

PRADEL, J.; BERLATO, D.; DOBROMYLSKYJ, M.; RASOTTO, R. Prognostic significance of histopathology in canine anal sac gland adenocarcinomas: Preliminary results in a retrospective study of 39 cases. **Veterinary and comparative oncology**, v. 16, n. 4, p. 518-528, 2018.

QUEIROGA, F. L.; PIRES, I.; PARENTE, M.; GREGORIO, H.; LOPES, C. S. COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. **The Veterinary Journal**, n.189, p. 77–82, 2011.

RAGHAVENDRA, U.; GUDIGAR, A.; RAO, T. N.; CIACCIO, E. J.; NG, E. Y. K.; ACHARYA, U. R. Computer aided diagnosis for the identification of breast cancer using thermogram images: A comprehensive review. **Infrared Physics & Technology**, p. 103041, 2019.

RAMOS-VARA, J. A.; MILLER, M. A.; DUSOLD, D. M. Immunohistochemical expression of CD31 (PECAM-1) in nonendothelial tumors of dogs. **Veterinary pathology**, v. 55, n. 3, p. 402-408, 2018.

RAMOS-VARA, J. A.; BEISSENHERZ, M. E.; MILLER, M. A.; JOHNSON, G. C.; PACE, L. W.; FARD, A.; KOTTLER, S. J. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 6, p. 597-608, 2000.

RAMOS-VARA, J. A.; MILLER, M. A.; DUSOLD, D. M. Immunohistochemical expression of CD31 (PECAM-1) in nonendothelial tumors of dogs. **Veterinary pathology**, v. 55, n. 3, p. 402-408, 2018.

RAPOSO, T. P.; PIRES, I.; CARVALHO, M. I.; PRADA, J.; ARGYLE, D. J.; QUEIROGA, F. L. Tumour-associated macrophages are associated with vascular endothelial growth factor expression in canine mammary tumours. **Veterinary Comparative Oncology**, v. 13, n. 4, p. 464-474, 2015.

REDAELLI, V.; TANZI, B.; LUZI, F.; STEFANELLO, D.; PROVERBIO, D.; CROSTA, L.; DI GIANCAMILLO. Use of thermographic imaging in clinical diagnosis of small animal: preliminary notes. **Annali dell'Istituto superiore di sanità**, v. 50, p. 140-146, 2014.

RODASKI, S.; DE NARDI, A.B. **Quimioterapia Antineoplásica em Cães e Gatos**, 3ªe.d. São Paulo, Med.Vet. Livros, p.57-101, 2008.

ROSS, J. T.; SCAVELLI, T. D.; MATTHIESEN, D. T.; PATNAIK, A. K. Adenocarcinoma of the apocrine glands of the anal sac in dogs: a review of 32 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 27, p. 349 – 355, 1991.

ZANUTO, E. B. M.

SADIA, H.; MANZOOR, S.; WAJID, A.; TAYYAB, M.; FIRYAL, S.; HASHMI, A. S.; MAHMOOD, K. et al. Cox-2 and brca1 have altered expression profile in different canine tumors. **JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 26, n. 1, p. 103-115, 2016.

SAITO, T.; TAMURA, D.; ASANO, R. Usefulness of selective COX-2 inhibitors as therapeutic agents against canine mammary tumors. **Oncology Reports**, n.31, p. 1637–1644, 2014.

SCHREMPP, D.; CHILDRESS, M.O.; STEWART, J.C.; LEACH, T.N.; TAN, K. M.; ABBO, A.H.; GORTARI, A.E.; BONNEY, P. L.; KNAPP, D.W. Metronomic administration of chlorambucil for treatment of dogs with urinary bladder transitional cell carcinoma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.242, n.11, p.1534-1538, 2013.

SHABADASH, S. A.; ZELIKINA, T. I. Once more about hepatoid circumanal glands of dogs. History of their discovery and reasons for revision of the structural and functional data. **Izvestiia Akademii Nauk Seriia Biologicheskaya**, v.2, p. 176 – 185, 2002.

SIMEONOV, R. Nuclear morphometry in 36 canine spontaneous perianal gland tumours. **Veterinaria Italiana**, v. 55, n. 4, p. 307-310, 2019.

SIMEONOV, R., SIMEONOVA, G. Quantitative analysis in spontaneous canine anal sac gland adenomas and carcinomas. **Research in veterinary science**, v. 85, n. 3, p. 559-562, 2008.

SKORUPSKI, K. A.; ALARCÓN, C. N.; DE LORIMIER, L. P.; LADOUCEUR, E. E.; RODRIGUEZ, C. O.; REBHUN, R. B. Outcome and clinical, pathological, and immunohistochemical factors associated with prognosis for dogs with early-stage anal sac adenocarcinoma treated with surgery alone: 34 cases (2002–2013). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 253, n. 1, p. 84-91, 2018.

SOBCZYŃSKA-RAK, A.; BRODZKI, A. VEGF and 17- β -estradiol Levels After Tamoxifen Administration in Canine Hepatoid Gland Adenomas and Hepatoid Gland Epitheliomas, **In vivo**, v. 28, p. 871-878, 2014.

SONG, C.; APPELYARD, V.; MURRAY, K.; FRANK, T.; SIBBETT, W.; CUSCHIERI, A.; THOMPSON, A. Thermographic assessment of tumor growth in mouse xenografts. **International journal of cancer**, v. 121, n. 5, p. 1055-1058, 2007.

ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, I. C.; SEVERIN, K.; HOHŠTETER, M.; ARTUKOVIĆ, B.; BECK, A.; KURILJ, A. G.; GRABAREVIĆ, Ž. et al. Incidence and types of canine tumours in Croatia. **Veterinarski, Arhiv**, n. 83, p. 31-45, 2013.

SOUZA, T. M. D.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. D. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 555-560, 2006.

SPUGNINI, E. P.; DOTSINSKY, I.; MUDROV, N. et al: Biphasic pulses enhance bleomycin efficacy in a spontaneous canine perianal tumor model, **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 26, n.4, p.483–487, 2007.

SPUGNINI, E. P.; DOTSINSKY, I.; MUDROV, N.; BUFALINI, M.; GIANNINI, G.; CITRO, G.; BALDI, A. Adjuvant electrochemotherapy for incompletely excised anal sac carcinoma in a dog. **in vivo**, v. 22, n. 1, p. 47-49, 2008.

ZANUTO, E. B. M.

STANNARD, A. A.; PULLEY, L. T. Tumors of the skin and soft tissues. In Moulton JE, editor: **Tumors in domestic animals**, Berkeley, University of California Press 1989.

SUZUKI, K.; MORITA, R.; HOJO, Y.; NOMURA, K.; SHIBUTANI, M.; MITSUMORI, K. Immunohistochemical characterization of neuroendocrine differentiation of canine anal sac glandular tumours. **Journal of comparative pathology**, v. 149, n. 2-3, p. 199-207, 2013.

VAIL, D. M.; WITHROW, S. J.; SCHWARTZ, P. D. et al. Perianal adenocarcinoma in the canine male: a retrospective study of 41 cases. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 26, p.329–334, 1990.

VCOG. Veterinary cooperative oncology group-common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1. 1. **Veterinary Comparative Oncology**, v. 14, n. 4, p. 417-446, 2011.

VICENTE, K; PERALES, R; TABACCHI, L. Frecuencia histopatológica de neoplasias perianales en caninos: casuística del Laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (2005-2012). **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 26, n. 4, p. 719-724, 2015.

THAUNAT, O. Soothing touch of CD31 protects endothelium during cellular immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 43, p. 13133-13134, 2015.

TREGGIARI, E.; BORREGO, J. F.; GRAMER, I.; VALENTI, P.; HARPER, A.; FINOTELLO, R.; ROMANELLI, G. Retrospective comparison of first-line adjuvant anthracycline vs metronomic-based chemotherapy protocols in the treatment of stage I and II canine splenic haemangiosarcoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 18, n. 1, p. 43-51, 2020.

TOBIAS, K. M. **Manual of Small Animal Soft Tissue Surgery**. 1 ed. Wiley-Blackwell, Cambridge, p.3-67, 2010.

TOSTES, R. A., BRANCO, A., CESTARI, F. K., CALEFFO, T., VIOTT, A. D. M. Retrospective study of canine cutaneous neoplasia. **Archives of Veterinary Science**, v. 22, n.1, 2017.

TOZON, N.; KODRE, V.; SERSA, G. et al: Effective treatment of perianal tumors in dogs with electrochemotherapy, **Anticancer Research**, v. 25, p.839–846, 2005.

TUNC, A. S.; ALCIGIR, M. E.; VURAL, S. A. Concurrent metastatic hepatoid gland carcinoma and eosophagogastric leiomyosarcoma in a dog. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 61, n. 1, p. 29-34, 2014.

TUREK, M. M.; FORREST, L. J.; ADAMS, W. M. et al. Postoperative radiotherapy and mitoxantrone for anal sac adenocarcinoma in the dog: 15 cases (1991-2001), **Veterinary Comparative Oncology**, v. 1, n. 2, p.94–104, 2003.

TUREK, M. M., WITHROW, S. J. Perianal tumors. In: WITHROW, S. J., VAIL, D. M., RODNEY, L. PAGE. **Small Animal Clinical Oncology**, 5 ed, Elsevier, 2013, p. 423 – 431.

ZANUTO, E. B. M.

TRIPP, C.D.; FIDEL, J.; ANDERSON, C.L.; PATRICK, M.; PRATT, C.; BRYAN, J.N. Tolerability of metronomic administration of lomustine in dogs with cancer. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.25, p. 278-284, 2011.

TRONCOSO, R. J., HERZBERG, D. E., MENESES, C. S., MULLER, H. Y., WERNER, M. P., BUSTAMANTE, H. Mechanical/thermal sensitivity and superficial temperature in the stump of long-term tail-docked dairy cows. **Peer J** 6:e 5213, 2018.

WASQUES, D. G. **Avaliação da concordância interobservadores de critérios morfológicos no diagnóstico de tumores de glândula hepatoide em cães e determinação do valor prognóstico de aspectos clínico-patológicos e marcadores imuno-histoquímicos**. 2018. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

WEERD, L.; MERCER, J.; WEUM, S. Dynamic Infrared Thermography. **Clinical Plastic Surgery**, v. 38, p. 277-292, 2011.

WILLIAMS, L. E.; GLIATTO, J. M.; DODGE, R. K., et al. Carcinoma of the apocrine glands of the anal sac in dogs: 113 cases (1985-1995), **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 223, p.825–831, 2003.

WILSON, G. P.; HAYES, H. M. Castration for treatment of perianal gland neoplasms in the dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 174, n. 12, p. 1301–1303, 1979.

WISHART, G. C.; CAMPISI, M.; BOSWELL, M.; CHAPMAN, D.; SHACKLETON, V.; IDDLES, S.; BRITTON, P. D. The accuracy of digital infrared imaging for breast cancer detection in women undergoing breast biopsy. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 36, n. 6, p. 535-540, 2010.

WOUDA, R.M.; BORREGO, J.; KEULER, N. S.; STEIN, T. Evaluation of adjuvant carboplatin chemotherapy in the management of surgically excised anal sac apocrine gland adenocarcinoma in dogs, **Journal of Veterinary Comparative Oncology**, v. 14, n. 1, 67-80, 2016.

XIE, W.; MCCAHERN, P.; JAKOBSEN, K.; PARISH, C. Evaluation of the ability of digital infrared imaging to detect vascular changes in experimental animal tumours. **International journal of cancer**, v. 108, n. 5, p. 790-794, 2004.

YU, X.; HAO, X.; WAN, J.; WANG, Y.; YU, L.; LIU, B. Correlation between ultrasound appearance of small breast cancer and axillary lymph node metastasis. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 44, n. 2, p. 342 - 349, 2018.

YUMUŞAK, Nihat; ÇALIŞKAN, Murat; KUTSAL, Osman. Fine needle aspiration cytology (FNAC) in the diagnosis of canine hepatoid gland tumors-A comparative study with histopathology. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 63, n. 3, p. 259-266, 2016.

9 ANEXOS

Anexo A- Questionário de efeitos adversos modificado de Malone et al., 2011, Miranda, 2017.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
SERVIÇO DE CIRURGIA DE PEQUENOS ANIMAIS-HOVET**

Nome do animal _____ N° de
registro _____

**Questionário de avaliação da toxicidade gastrointestinal em cães
submetidos à quimioterapia como tratamento adjuvante do tumor perianal canino
(modificado de MALONE et al., 2011, MIRANDA, 2017)**

Assinale a alternativa que melhor descreve e aponte se necessário as alterações que seu animal apresentou pós tratamento quimioterápico:

- 1- Como está o apetite do seu animal desde a última sessão?
 - a) Normal (vá direto para a questão 3)
 - b) Aumentado
 - c) Come normalmente, porém é preciso incentivá-lo a comer ou mudar a dieta
 - d) Diminuído por 1-2 dias
 - e) Diminuído por 3-5 dias
 - f) Diminuído por 6 dias ou mais

- 2- Se o seu animal teve o apetite diminuído:
 - a- Como foi tratado?
 - b- Por quanto tempo foi necessário o tratamento?

- 3 O seu animal teve algum episódio de vômito desde a última sessão?
 - a) Não (vá direto para a questão 9)
 - b) Sim
 - c) Não sei

- 4 Quantas vezes ele vomitou?
 - a) 1-2 vezes
 - b) 3-5 vezes
 - c) 6 vezes ou mais

- 5 Se o seu animal teve vômito:
 - a) Como foi tratado?

- b) Por quanto tempo foi necessário o tratamento?

- 6 Por quanto tempo o vômito persistiu?
a) 1 dia
b) 2-4 dias
c) 5 dias ou mais
- 7 Se o seu animal vomitou mais de 1 vez, qual foi o intervalo de tempo entre os vômitos?
a) Menor ou igual a 15 minutos de intervalo
b) Mais de 15 minutos de intervalo
c) Com uma hora ou mais de intervalo
- 8 Quanto tempo após a última sessão começou o vômito?
a) Horas
b) 1 dia
c) 2-3 dias
d) 4 dias ou mais
- 9 Descreva as fezes do seu animal desde a última sessão
a) Normais
b) Amolecidas
c) Diarreia
- 10 Se o seu animal teve diarreia:
a) Como foi tratada?

- b) Por quanto tempo foi necessário o tratamento?

- 11 Quantas vezes ao dia seu animal teve diarreia?
a) Uma
b) Duas
c) 3-6 vezes ao dia
d) 7 vezes ao dia ou mais
- 12 Quanto tempo após a última sessão começou a diarreia?
a) Horas
b) 1 dia
c) 2-3 dias
d) 4 dias ou mais